

CYNTIA SILVA FERREIRA

**ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM
MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE *GALLUS DOMESTICUS***

Ouro Preto – MG, março de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM
MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE *GALLUS DOMESTICUS***

AUTOR: Cyntia Silva Ferreira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Genômica e Proteômica.

Ouro Preto – MG, março de 2013

F383a Ferreira, Cyntia Silva.
Atividade anti-angiogênica de inibidores de tripsina em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus* [manuscrito] / Cyntia Silva Ferreira. - 2013.
xv, 95f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Área de concentração: Genômica e Proteômica.

1. Inibidores químicos - Inibidores Bowman-Birk - Teses. 2. Proteínas - Dedos de Zinco - Teses. 3. Neovascularização - Angiogênese - Teses. 4. Proteínas - Proteassoma - Teses. 5. Peptídeos - Síntese - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 577.112.6:611.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Proteômica – ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

À minha família

meus maiores motivos para lutar,

dedico esta conquista.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao meu **marido José Augusto** pelas horas de estudo, dedicação e companheirismo, e meu **filho João Renato**, pela alegria de ser mãe, por todo o carinho e emoções vividas, pela compreensão e amor.

Aos meus **avós, Maria da Glória** (*in memoriam*) e **José Carlos**, por todo o apoio durante minha vida. Agradeço por todo esforço, carinho e dedicação que sempre tiveram comigo.

Ao **Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade**, pela oportunidade e orientação durante o desenvolvimento do mestrado.

Ao **Prof. Dr. William de Castro Borges**, pela colaboração para a finalização desse trabalho.

À toda **equipe do LEP** e ao técnico **José Henrique Braga Fortes**.

Aos **laboratórios do NUPEB**, pela permissão e ajuda no uso de diversos equipamentos.

À **Universidade Federal de Ouro Preto** por todas as oportunidades oferecidas.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

À todos os **amigos** conquistados durante essa etapa, em especial aos amigos de todas as horas **Maurício, Rafaela, Daniela, Bruna (Ivete), Diogo (Diego), Gleise (Gatona), Fernanda, Kaliny e Raianne**.

À todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram no processo produtivo para o desenvolvimento e conclusão da pesquisa.

ÍNDICE

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
1. Introdução	2
1.1. Inibidores de Proteases.....	2
1.2. Inibidores do tipo Bowman-Birk.....	3
1.2.1. Resíduos envolvidos na interação com as enzimas proteolíticas.....	4
1.2.2. Inibidores Bowman Birk como agentes preventivos do câncer e doenças neurodegenerativas.....	6
1.2.3. Peptídeos sintéticos derivados do inibidor Bowman-Birk.....	8
1.3. Pentamidina.....	10
1.4. Restrição conformacional de peptídeos.....	12
1.5. Proteínas com motivos do tipo dedo de zinco.....	14
1.6. Angiogênese.....	17
1.6.1. Angiogênese no câncer.....	20
1.6.2. Avaliação da atividade angiogênica.....	20
2. Justificativa	23
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. Materiais e métodos	27
4.1. Síntese dos inibidores peptídicos.....	27
4.1.1. Ativação da resina.....	28
4.1.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados.....	28
4.1.3. Clivagem do peptídeo.....	29
4.1.4. Ciclização dos peptídeos contendo cisteína.....	29
4.1.5. Reação de redução e prevenção de formação de pontes dissulfeto.....	30

4.1.6. Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	30
4.1.7. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF <i>electrospray</i>	31
4.1.8. Determinação das soluções estoque de peptídeo.....	31
4.2. Determinação de grupos sulfidril livres nos peptídeos com motivo dedo de zinco.....	32
4.3. Titulação com cobalto (Co ²⁺).....	32
4.4. Ensaio de competição com Zn ²⁺	33
4.5. Ensaio Enzimáticos.....	33
4.5.1. Atividade inibitória anti-tripsina bovina.....	33
4.5.2. Atividade inibitória anti-quimotripsina bovina.....	34
4.5.2.1. Cálculo da Atividade Inibitória (UAIN).....	34
4.5.3. Taxa de hidrólise enzimática.....	35
4.5.4. Determinação da estabilidade térmica dos inibidores.....	35
4.5.5. Determinação da resistência dos inibidores ao ambiente redutor.....	35
4.6. Extração de proteínas solúveis.....	36
4.6.1. Fígado de Ratos Wistar.....	36
4.7. Cromatografia de filtração molecular em Fractogel® EMD BioSEC (S).....	36
4.7.1. Identificação das frações enriquecidas com o proteassoma 20S pela medida da atividade quimotripsina-símile.....	37
4.8. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
4.9. Avaliação das atividades peptidásicas do proteassoma na presença de inibidores.....	38
4.10. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de <i>Gallus gallus domesticus</i>	38
4.10.1. Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica.....	39
4.11. Análise estatística.....	39
5. Resultados e discussão.....	41
5.1. Planejamento dos peptídeos inibidores análogos ao BBI.....	41

5.2. Purificação e caracterização dos peptídeos cíclicos.....	43
5.3. Purificação e caracterização dos peptídeos contendo o motivo dedo de zinco.....	45
5.4. Determinação de grupos sulfidril livre.....	48
5.5. Titulação dos fragmentos peptídicos com íon Cobalto.....	49
5.6. Ensaio de competição entre Cobalto e Zinco.....	51
5.7. Ensaio Enzimáticos.....	53
5.7.1. Atividade inibitória anti-tripsina e anti-quimotripsina bovina.....	54
5.7.2. Resistência à hidrólise enzimática.....	56
5.7.3. Determinação da estabilidade térmica dos inibidores.....	57
5.7.4. Determinação da resistência dos inibidores ao ambiente redutor.....	58
5.8. Ensaio de inibição do proteassoma 20S.....	59
5.8.1. Atividade inibitória sobre o proteassoma 20S.....	61
5.8.1.1. Avaliação da atividade quimotripsina-símile.....	61
5.8.1.2. Avaliação da atividade tripsina-símile.....	63
5.9. Ensaio angiogênico em membrana corioalantóica de <i>Gallus gallus domesticus</i> ...65	
6. Conclusões.....	71
7. Perspectivas.....	73
8. Referências bibliográficas.....	75
9. Apêndice.....	93

RESUMO

Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são proteínas contendo dois domínios inibitórios distintos para enzimas tripsina- e quimotripsina-símile. Muitos trabalhos mostram o uso desses inibidores como agentes anti-cancerígenos, no entanto, estudos prévios do nosso laboratório revelaram uma biodistribuição limitada do BBI. Peptídeos sintéticos análogos aos domínios inibitórios do BBI também apresentaram baixa biodisponibilidade, possivelmente devido à degradação. Com o objetivo de construir inibidores mais estáveis foram adicionados motivos do tipo dedo de zinco – sequências de aminoácidos com reconhecida função estabilizadora. Esses inibidores (CPI- e HPI-trip, para tripsina e CPI- e HPI-quimo, para quimotripsina) foram comparados ao inibidor nativo e às suas respectivas alças de inibição YCT-trip e YCA-quimo. A estabilidade dessas espécies químicas foi testada do ponto de vista térmico, redutor e de resistência à hidrólise. Os peptídeos sintéticos contendo dedo de zinco mostraram comportamento similar aos inibidores convencionais. A atividade biológica dos inibidores foi avaliada no complexo proteolítico proteassoma 20S de Ratos Wistar e em membrana corioalantóica de *Gallus gallus domesticus*. Os inibidores de quimotripsina apresentaram atividade inibitória sobre o proteassoma 20S, mas não geraram alterações na membrana corioalantóica. Da mesma forma, os análogos contendo o motivo dedo de zinco apresentaram baixa atividade tanto no proteassoma quanto na membrana. Por outro lado, os inibidores de tripsina apresentaram atividade inibitória sobre o proteassoma e produziram respostas anti-angiogênicas na concentração de 100 nM, de maneira relacionada à atividade da pentamidina, – uma droga com elevada atividade anti-tripsina. Ao contrário da pentamidina, o inibidor Bowman-Birk é considerado isento de toxicidade em humanos, colocando essa classe de inibidores como potenciais drogas anti-angiogênicas.

ABSTRACT

Bowman-Birk inhibitors (BBI) are proteins containing two distinct inhibitory domains for trypsin- and chymotrypsin-like enzymes. Several studies demonstrate the use of these inhibitors as anticancer agents, however, previous works from our laboratory showed a limited biodistribution of BBI. Synthetic peptides, analogous to the inhibitory domains of BBI, also revealed low bioavailability, possibly due to degradation. Aiming for more stable inhibitors, we added zinc finger motifs - amino acid sequences with known stabilizer function. These inhibitors (CPI and HPI-trip, anti-trypsin, and CPI and HPI-quimo, anti-chymotrypsin) were compared to the native inhibitor and their respective cyclic peptides YCT-trip and YCA-quimo. These chemical species were tested for their stability. We evaluated thermal, reducing and hydrolysis resistance. The synthetic peptides containing the zinc finger motif showed similar behavior to conventional inhibitors. The biological activity of the inhibitors was evaluated in the proteolytic complex 20S proteasome from Wistar Rat and chorioallantoic membrane from *Gallus gallus domesticus*. Chymotrypsin inhibitors showed inhibitory activity on the 20S proteasome, but no changes were observed in chorioallantoic membrane. Similarly, the analogs containing the zinc finger motif showed low activity on both the proteasome and the membrane. Moreover, inhibitors of trypsin presented inhibitory activity on the proteasome and produced anti-angiogenic responses in a concentration of 100 nM, related to the activity of pentamidine, - a drug with high anti-trypsin activity. Unlike pentamidine, Bowman-Birk inhibitor is considered to be free of toxicity in humans, placing this class of inhibitors as potential anti-angiogenic drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila	LCMS-IT-TOF - <i>Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight</i>
BApNA - N α -Benzoil-DLArginil-p-Nitroanilida	MM - Massa Molecular
BTpNA - N α -Benzoil-LTirosil-p-Nitroanilida	mM - Milimolar
BBI - Inibidores do tipo Bowman-Birk	m/z - Razão massa/carga
BBI-E - BBI enriquecido	nM - Nanomolar
BBI-PA – BBI purificado em coluna de afinidade de tripsina	PMM - Padrão de Massa Molecular
BCA - <i>Bicinchoninic Acid</i>	PSA - Antígeno Prostático Específico
CAM – Ensaio da Membrana Corioalantóica	SDS - Dodecil sulfato de sódio
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
DCM - Diclorometano	SPFS - Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
DIPC - Diisopropilcarbodiimida	TEMED - N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina
DMH - 1,2-dimetilhidrazina	TFA - Ácido trifluoracético
DMF - Dimetilformamida	tBoc - t-Butiloxicarbonila
DMSO - Dimetilsulfóxido	tBu - Terc-butila
DTT - Ditioneitol	TRT - Tritel
E - Coeficiente de extinção molar	UAF - Unidades arbitrárias de fluorescência
FGF - <i>Fibroblast Growth Factor</i>	UAI - Unidade de Atividade Inibitória
Fmoc - 9- Fluorenilmetiloxicarbonila	UV - Ultravioleta
FE - Fase estacionária	Ub - Ubiquitina
FM - Fase móvel	VEGF - <i>Vascular endothelial growth factor</i>
HPLC - <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	
IC50 - Concentração Inibitória 50%	
Ki - Constante de inibição	

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do BBI da soja.....	4
Figura 2: Esquema representativo da interação entre tripsina e um inibidor Bowman-Birk.....	5
Figura 3: Estrutura química da pentamidina e ligação do fármaco e de outros derivados da benzamidina ao sítio ativo da β -tripsina bovina.....	11
Figura 4: Classificação estrutural dos motivos dedos de zinco.....	15
Figura 5: Esquema das interações entre aminoácidos e bases no DNA no reconhecimento de um sítio de ligação por uma proteína com motivos dedos de zinco	16
Figura 6: Comparação estrutural de motivos dedo de zinco que se ligam à proteínas e ao DNA.....	17
Figura 7: Etapas da angiogênese.....	19
Figura 8: Estrutura primária dos inibidores peptídicos cíclicos e com motivos dedo de zinco sintetizados.....	43
Figura 9: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos cíclicos sintetizados.....	44
Figura 10: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo <i>electrosray</i> dos peptídeos inibidores cíclicos YCT-trip e YCA-quimo.....	44
Figura 11: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos contendo motivo dedo de zinco.....	46
Figura 12: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo <i>electrosray</i> dos peptídeos contendo motivo dedo de zinco.....	47
Figura 13: Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com os peptídeos.....	51
Figura 14: Dependência da banda de transferência de cargas $S \rightarrow Co(II)$ a 350 nm.....	51
Figura 15: Deslocamento dos espectros de absorção dos peptídeos quando em ensaio de competição com zinco.....	52
Figura 16: Ensaio de atividade enzimática na presença de inibidores de proteases.....	55
Figura 17: Taxa de hidrólise enzimática.....	56
Figura 18: Estabilidade térmica dos inibidores.....	57
Figura 19: Resistência dos inibidores ao ambiente redutor.....	58

Figura 20: Cromatograma a 280 nm e medidas da atividade peptidásica quimotripsina-símile dos extratos proteicos de fígado de Ratos Wistar na ausência e presença de MG-132.....	60
Figura 21: SDS-PAGE 10% das frações enriquecidas com proteassoma 20S identificadas pela medida da atividade quimotripsina-símile	61
Figura 22: Avaliação da atividade quimotripsina-símile do proteassoma na presença dos inibidores.....	63
Figura 23: Avaliação da atividade tripsina-símile de proteassoma na presença dos inibidores.....	64
Figura 24: Número de bifurcações avaliado na presença de inibidores de proteases.....	67
Figura 25: Atividade anti-angiogênica dos inibidores de tripsina na concentração de 10^2 nM.....	68
Figura 26: Membranas corioalantóicas após inoculação de cinco doses diárias de 7 μ L de pentamidina.....	69
Figura 27: Curva dose-resposta da avaliação da atividade quimotripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar na presença dos inibidores.....	93
Figura 28: Curva dose-resposta da avaliação da atividade tripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar na presença dos inibidores.....	93
Figura 29: Comparação do número de bifurcações e controle positivo (Estradiol).....	94
Figura 30: Membranas corioalantóicas após inoculação de cinco doses diárias de 7 μ L de cada inibidor.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI, suas respectivas nomenclaturas e sequências.....	27
Tabela 2: Valores de massa molecular encontrados por análise em LC-MS.....	47
Tabela 3: Análise da formação de complexo pela titulação de grupos sulfidril.....	53
Tabela 4: IC 50 dos inibidores testados.....	54

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inibidores de proteases

Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e representam aproximadamente 2% do total de proteínas celulares, sendo normalmente sintetizadas sob a forma de zimogênio e ativadas por ação de outras proteases ou através de processo autocatalítico (Turk, 2006). De acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, podem ser divididas em exopeptidases - que atuam a partir das regiões N e/ou C terminal - ou endopeptidases, as quais clivam ligações peptídicas internas (Otlewski *et al.*, 2005). Podem ser ainda divididas em cinco subclasses, com base em seu sítio ativo: metalo-proteases, serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e treonino-proteases. Dentre tais enzimas, aproximadamente um terço pode ser classificada como serino-proteases (Barrett, 1986), as quais são assim denominadas por possuírem um mecanismo catalítico comum que envolve um resíduo de serina (Ser-195) no sítio ativo (Voet *et al.*, 2000).

Quanto à especificidade pelo substrato, são observadas diferenças dentro da família das serino-proteases, apesar de seu sítio ativo ser bastante conservado no que se refere à tríade catalítica (**His57**, **Asp102** e **Ser195**) (Ishida, 2006). Como exemplo, as principais enzimas pertencentes a esse grupo, tripsina e quimotripsina, reconhecem substratos diferentes apesar de apresentarem alta similaridade estrutural (Perona *et al.*, 1995). A tripsina hidrolisa ligações peptídicas na extremidade carboxila de L-aminoácidos básicos, como a arginina (**Arg**) e a lisina (**Lys**), enquanto a quimotripsina catalisa a hidrólise de ligações após resíduos de leucina (**Leu**), fenilalanina (**Phe**) e tirosina (**Tyr**). Assim, muitos peptideos naturais inibidores de tripsina possuem uma arginina ou lisina, que se ligam ao sítio ativo da enzima, localizado na vizinhança da tríade catalítica responsável pela catálise (Bertrand *et al.*, 1996).

Nesse sentido, a homeostase celular requer um equilíbrio entre proteases e seus inibidores endógenos. Quando esse equilíbrio é perdido em favor das proteases, podem-se desencadear processos inflamatórios, artrites reumatóides e angiogênese patológica (Puente *et al.*, 2003). Além disso, estudos demonstram que pelo menos três famílias de proteases – serino, cisteíno e metalo-proteases – estão envolvidas no desenvolvimento tumoral (Powers *et al.*, 2002). A tripsina, por exemplo, está envolvida nos processos de progressão tumoral, contribuindo para a degradação da matriz extracelular, ativando metalo-proteases e

modulando o comportamento celular através da ativação de receptores, tais como os receptores de plasminogênio e de fatores de crescimento (Kennedy *et al.*, 2002). Ao passo que diferentes tipos de inibidores de proteases podem prevenir a carcinogênese, os que se mostram mais eficientes contra esse processo são os que atuam sobre a quimotripsina ou proteases quimotripsina-símile (Koblinski *et al.*, 2000).

Inibidores de proteases (endógenos ou sintéticos) atuam como pseudo-substratos exibindo afinidade aos sítios catalíticos da enzima, e podem ser classificados em dois grupos: inibidores peptidomiméticos de baixo peso molecular e inibidores proteicos compostos de uma ou mais cadeias peptídicas (Fear *et al.*, 2007). Estes inibidores são amplamente distribuídos na natureza, estando presentes em animais, plantas e microorganismos, nos quais controlam a proteólise dentro do próprio organismo ou inativam proteases de espécies predadoras. Particularmente, as plantas são boas fontes de inibidores de protease, nas quais esses compostos protegem contra doenças, pragas e consumo por herbívoros (Ryan, 1990). Os inibidores de proteases mais bem estudados e caracterizados até o momento são os inibidores de serino-proteases, que apresentam inibição estritamente competitiva (Richardson, 1991).

Estudos epidemiológicos corroboram os efeitos supracitados e correlacionam o consumo de alimentos ricos em inibidores de proteases à redução da incidência de diversos tipos de cânceres (Kelloff *et al.*, 2000). Dentro desse contexto, existem vários inibidores de proteases que fazem parte da dieta humana e que possuem a habilidade de inibir enzimas quimotripsina-símiles. A soja é um exemplo de leguminosa rica em componentes com reconhecida ação anticarcinogênica, incluindo ácido fitico, saponinas, isoflavonóides e inibidores de serino-proteases, os quais representam aproximadamente 6% do total de proteínas encontradas em sua composição (Messina & Barnes, 1991). Dentre os inibidores de proteases, encontram-se os inibidores de tripsina do tipo Kunitz (KTI) e os inibidores Bowman-Birk (Losso, 2008). Todavia, os inibidores Bowman-Birk são reconhecidamente os mais potentes agentes antitumorais presentes nas sojas (Kennedy *et al.*, 2002).

1.2. Inibidores do tipo Bowman Birk

Os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) são inibidores proteicos de serino-proteases isolados pela primeira vez em sementes de soja por Bowman, em 1946, e caracterizados por Birk e colaboradores em 1963, sendo posteriormente identificados em outras leguminosas e

gramíneas (Clemente *et al.*, 2011). Os BBI's encontrados na soja são proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 8KDa) geralmente compostos por 71 resíduos de aminoácidos (Losso, 2008). Possuem sete pontes dissulfeto que permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois sítios reativos independentes que inibem, de forma reversível, as enzimas semelhantes à tripsina e quimotripsina (Figura 1) (Deshimaru *et al.* 2004). Cada sítio reativo é formado por nove resíduos de aminoácidos, e a característica estrutural mais interessante do BBI é a ausência de uma “cavidade hidrofóbica”, característica marcante em proteínas globulares e maior responsável pelo arranjo e estabilidade dessas (Barbosa *et al.*, 2007).

Devido à variabilidade dos aminoácidos presentes no sítio ativo, os BBI's possuem diferentes especificidades, sendo moléculas com potencial para inibir além da tripsina e quimotripsina, outras serino–proteases envolvidas na regulação de sistemas fisiológicos de organismos superiores. Assim, além dessas enzimas, o BBI pode inibir a catepsina G, elastase (Larionova *et al.*, 1993) e cimase (Ware *et al.*, 1997).

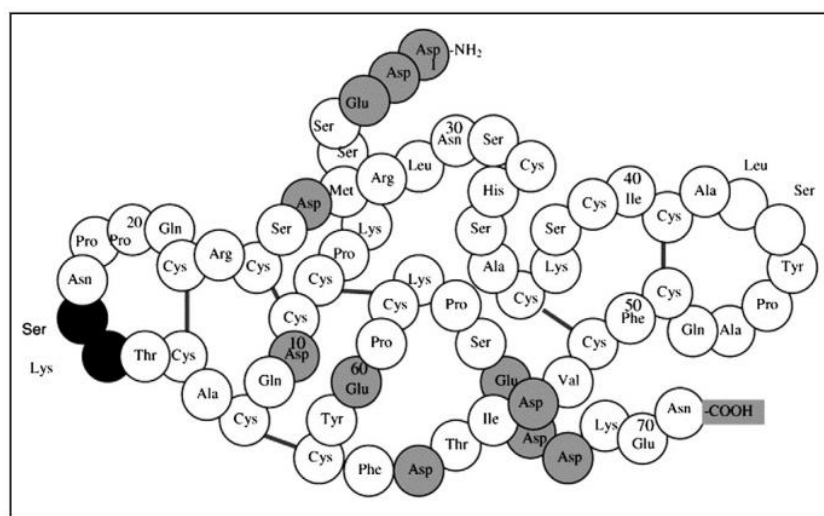


Figura 1: Estrutura do BBI da soja. À direita está representado o sítio inibitório para a quimotripsina (Leu – Ser, bolas brancas), e do lado esquerdo o sítio inibitório para a tripsina (Lys – Ser, bolas pretas). Adaptado de Safavi & Rostami (2012).

1.2.1. Resíduos envolvidos na interação com as enzimas proteolíticas

As posições dos aminoácidos do inibidor proteico são definidas de acordo com o aminoácido que interage com o resíduo catalítico da enzima proteolítica (Ishida, 2006). Esse aminoácido sofrerá um ataque nucleofílico sobre a carbonila da ligação peptídica, que será

quebrada. O aminoácido presente nessa posição é denominado P1 e aqueles que se situarem à montante da carbonila envolvida na hidrólise serão numerados gradativamente, P2, P3, e assim sucessivamente, e os aminoácidos que se situarem à jusante daquele serão numerados da seguinte forma: P1', P2' e assim por diante (Figura 2). Os sítios de interação da enzima em posições correspondentes aos aminoácidos do peptídeo que se acomodam no sítio catalítico são denominados S1, S2, S1', S2' (Gariani *et al.*, 1999).

A complementaridade estrutural do sítio reativo do BBI ao sítio ativo da enzima a ser inibida propicia uma ligação reversível de alta afinidade entre o inibidor e a protease. O encaixe adequado nos sítios enzimáticos impede as mudanças conformacionais necessárias à catálise, gerando um complexo típico enzima-inibidor com uma barreira energética desfavorável à hidrólise (Sattar *et al.*, 2004).

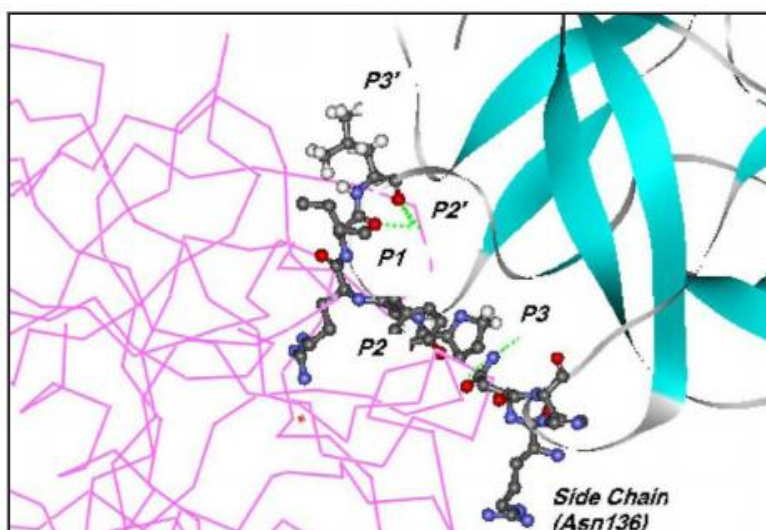


Figura 2: Esquema representativo da interação entre tripsina (domínios identificados em magenta e verde) e um inibidor Bowman-Birk (representado em modelo de bastões e bolas). Adaptado de Sattar *et al.*, 2004.

Jensen e colaboradores (1996) afirmam que após a formação do complexo, o BBI é clivado muito lentamente e estudos de avaliação da taxa de hidrólise por tripsina de peptídeos sintéticos derivados do BBI, comprovam essa afirmação. Nesses ensaios, após incubação dos inibidores com a enzima, essa apresentou atividade residual crescente em função do tempo, a qual foi atribuída à hidrólise do inibidor (Gariani *et al.*, 1999).

Ainda quanto sua estrutura, embora as análises das seqüências das alças de inibição revelem que essas sejam extremamente conservadas (McBride *et al.*, 1998) o BBI apresenta variações pontuais muito importantes que podem modificar suas especificidades; as posições

mais relevantes são P1 e P2'. Variações na posição P2' resultam em diferenças na estabilidade do inibidor quanto à sua velocidade de hidrólise (Gariani *et al.*, 1999). Nos inibidores para tripsina essas variações são muito importantes, visto que S2' constitui o sítio alostérico da enzima (Andrade & Mares-Guia, 1990).

1.2.2. Inibidores Bowman Birk como agentes preventivos do câncer e doenças neurodegenerativas

Vários estudos demonstraram que o BBI possui a capacidade de supressão de câncer em diferentes espécies animais e em diferentes órgãos e tecidos quando administrados na dieta, ou aplicados de forma intravenosa e intraperitoneal (Kennedy, 1998). Esse inibidor tem sido utilizado em sua forma purificada (PBBI) ou na forma de extrato de soja enriquecido ou concentrado em BBI (BBIC). Ambas as formas apresentam atividades semelhantes, suprimindo o processo carcinogênico induzido quimicamente ou por radiação, em sistemas *in vitro* e *in vivo*, em concentrações molares extremamente baixas (Billings *et al.*, 1990).

Dessa forma, o extrato de soja enriquecido em BBI (BBIC) alcançou status de “novo medicamento investigativo” pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1992, e testes para avaliar a atividade anti-carcinogênica do BBI em populações humanas estão em andamento por mais de uma década com eficácia clínica e mínima toxicidade (Armstrong *et al.*, 2000; Kennedy, 2002). Em experimentos com células normais, Yavelow e colaboradores (1985) observaram a supressão da transformação celular maligna induzida por raios-X, após o tratamento das células com BBI. Esses dados indicam que o inibidor parece agir seletivamente sobre células malignas, sendo sua toxicidade praticamente nula em células normais. Como mostrado por Dittmann e colaboradores (2008), em experimentos com fibroblastos submetidos à radiação, o BBI exerceu efeito radioprotetor, com consequente aumento da sobrevivência, apenas sobre células normais. Células com mutações no gene TP53 (presentes em tumores malignos) tornaram-se mais susceptíveis à radiação. Os autores atribuíram essa seletividade à capacidade do BBI de aumentar a internalização nuclear de fatores responsáveis pela reparação do DNA, aos quais a proteína TP53 liga-se para a formação do complexo de reparo. Desse modo, a ocorrência de mutações no gene TP53 diminuiria a eficiência do reparo de danos ao DNA causados por radiação, aumentando o impacto da radioterapia sobre células cancerosas.

O BBI também reduz a sobrevivência de células cancerígenas de ovário humano de maneira dose-dependente e para alguns tipos de câncer em que o crescimento das células tumorais é lento, como tumores de próstata, o BBI pode ser considerado como agente terapêutico (McCormick *et al.*, 2007). Malkowicz e colaboradores (2001) realizaram ensaios clínicos de fase I com pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna e observaram que após seis meses de tratamento com BBIC esses pacientes apresentaram redução dos níveis plasmáticos de PSA e do tamanho das lesões. Kennedy e Wan (2002) também verificaram a inibição do crescimento de células cancerígenas de próstata humano, protegendo-as de lesões metastáticas, sem afetar células epiteliais normais da próstata.

Resultados dos estudos clínicos de fase I e II com pacientes portadores de leucoplasia oral mostraram que os pacientes tratados com BBIC tiveram melhora do quadro clínico, boa tolerância ao inibidor administrado oralmente e não apresentaram nenhum sinal de toxicidade (Armstrong *et al.*, 2000).

A adição de BBI na dieta reduziu a incidência de adenocarcinoma de cólon em modelos animais com carcinoma induzido e em animais geneticamente modificados susceptíveis a cânceres espontâneos nessa região (Billings *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1996). Caccialupi e colaboradores (2010) também verificaram tais propriedades anti-proliferativas sobre células de câncer de cólon humano.

O BBI também se mostrou ativo sobre células epiteliais de mama humana. Nesse modelo, além da atividade anti-proteásica típica, o inibidor mostrou influência sobre a apoptose e a permeabilidade da membrana lisossomal de células MCF-7 de câncer de mama, revelando novos alvos celulares e mecanismos anti-cancerígenos para o BBI (Joanitti *et al.*, 2010). Na mesma linhagem de células, o BBI diminuiu a taxa de crescimento celular de maneira associada à inibição da atividade quimotripsina-símile do proteassoma. O tratamento com o inibidor levou ao acúmulo de substratos poli-ubiquitinados incluindo reguladores do ciclo celular (Chen *et al.*, 2005).

Além de um agente promissor contra o câncer, alguns trabalhos reportam que a capacidade do BBI de inibir diversas proteases (como elastase de leucócitos, catepsina G e cimase de mastócitos), lhe confere propriedades anti-inflamatórias (Dai *et al.*, 2012). Somados aos efeitos relacionados à inibição de proteases, outros trabalhos mostraram que o BBI pode diminuir a inflamação por meio da regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias. A proteção oriunda dessa capacidade imunorregulatória mostra-se especialmente importante

em doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC), como é o caso da encefalomielite autoimune e processos inflamatórios que se seguem a infecções. Em ensaios com células neuronais, o inibidor exerceu efeito protetor ao diminuir a liberação de interleucina 1 β , 6 e TNF α – citocinas neurotóxicas – em células de macrófagos ativadas por lipopolissacarídeos bacterianos, além de aumentar a expressão de IL-10, uma importante citocina imunomodulatória (Li *et al.*, 2011). O aumento nos níveis de IL-10 foi observado também em animais, onde o BBI diminuiu a infiltração do cordão espinhal por células inflamatórias bem como alterou a expressão de suas moléculas de adesão, eliminando a inflamação do SNC em ensaios de encefalomielite autoimune experimental. Esses estudos dão base ao uso do BBI no tratamento oral de doenças neuronais (Gran *et al.*, 2006; Safavi & Rostami, 2012).

O efeito quimiopreventivo do BBI é também associado com o controle do processo de apoptose e divisão celular, via inibição do proteassoma, um importante complexo proteolítico regulador de substratos protéicos intracelulares (Voutsadakis, 2008). O sistema ubiquitina-proteassoma é essencial para a manutenção da maquinaria celular eucariota, atuando na regulação de vários processos fisiológicos, sendo considerado um alvo emergente para a terapia do câncer (Tanaka, 2009). O centro catalítico deste complexo, denominado proteassoma 20S, é formado por 28 subunidades agrupadas em duas famílias: as subunidades β das quais 3 são catalíticas e as subunidades α estruturais. As subunidades catalíticas possuem atividade do tipo caspase-símile, tripsina-símile e quimotripsina-símile (Kisselev *et al.*, 2006).

1.2.3. Peptídeos sintéticos derivados do inibidor Bowman-Birk

Com o intuito de identificar o papel de resíduos de aminoácidos específicos no processo inibitório, vários peptídeos sintéticos consistindo de um único domínio de inibição têm sido produzidos (McBride *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que um peptídeo monocíclico composto por nove resíduos análogo ao *loop* de tripsina foi suficiente para preservar as propriedades inibitórias do inibidor nativo (Nishino *et al.*, 1977).

A importância de estudos sobre a avaliação da relação estrutura-atividade de peptídeos sintéticos foi mostrada também por Fernandez e colaboradores (2007). Os autores, por meio de modelagem computacional e experimentos de *phage display* e ELISA, levantam a possibilidade da construção de peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI e

que apresentem as características necessárias para a interação tanto com a tripsina quanto com a quimotripsina no mesmo *loop* de resíduos.

Recentemente, foi caracterizado um octadecapeptídeo isolado da secreção cutânea do sapo *Huia versabilis*, que contém um *loop* peptídico de 11 resíduos com um sítio reativo P1-P1' (Lys8-Ser9) entre duas cisteínas, assemelhando-se as alças inibitórias dos BBI. Uma replicata desse peptídeo, nomeada HV-BBI, foi sintetizada e analisada quanto sua atividade anti-tripsina e anti-quimotripsina. Quando sintetizado em sua forma nativa (com um resíduo de lisina na posição P1), o peptídeo mostrou-se um potente inibidor de tripsina com Ki de 19nM. A substituição desse resíduo por arginina resultou em uma redução significativa da potência (Ki 57 nM), enquanto que a substituição por fenilalanina resultou na abolição completa da atividade inibitória da tripsina (Song *et al.*, 2008). Debowski e colaboradores (2012) mostraram que a substituição por um resíduo de fenilalanina na posição P1 no peptídeo original (com 18 resíduos) acarretou na troca da especificidade de tripsina por quimotripsina, e a retirada dos dois primeiros resíduos da sequência (externos ao *loop*) conferiu propriedades antimicrobianas contra *S. aureus* e *E. coli* ao HV-BBI.

Apesar dos diversos efeitos alcançados em experimentos *in vitro*, a aplicação de peptídeos na prevenção ou tratamento do câncer e outras doenças é dificultada pela sua curta meia-vida plasmática e pobre absorção gastrointestinal (Wang & Shen, 2000). Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que o inibidor obtido de semente da planta *Macrotyloma axillare* (BBIM) apresentou distribuição limitada ao interior dos vasos sanguíneos, com pequena distribuição para os tecidos (Santos, 2006). Alternativamente, o uso de peptídeos sintéticos mimetizando os domínios inibitórios de tripsina e quimotripsina do BBI apresentaram apenas 5% de biodisponibilidade, possivelmente devido à degradação (Amorin, 2009). Esses resultados incentivam a construção de peptídeos sintéticos com maior estabilidade e que conservem a atividade biológica dos homólogos naturais. Além disso, a síntese de peptídeos mostra vantagem sobre processos de enriquecimento de extratos naturais e expressão heteróloga, no que tange à pureza do produto final. Especificamente no caso do BBI, as etapas de purificação do inibidor não eliminam completamente a contaminação por lunasina, outra proteína encontrada em extratos vegetais, levando à suposições sobre a atividade conjunta de ambos em ensaios de atividade biológica (Hernandez-Ledesma *et al.*, 2009). A presença de contaminantes proteicos é abolida em amostras de peptídeos sintéticos, reduzindo a possibilidade de alteração dos resultados.

1.3. Pentamidina

Como citado anteriormente, as serino proteases tripsina-símile desempenham funções essenciais em muitos processos fisiológicos (Puente *et al.*, 2003). Esta classe de enzimas constitui um importante alvo para a química medicinal contemporânea, uma vez que muitas doenças estão relacionadas com falhas na regulação metabólica mediada por elas (Talhout & Engberts, 2001). Como alternativa para a inibição da atividade desregulada dessas proteases devem ser ressaltados os inibidores sintéticos, que muitas vezes são baseados em grupos análogos aos substratos dessas enzimas. Por exemplo, a benzamidina, cuja estrutura mimetiza a da arginina, é o componente primário de muitos inibidores maiores e mais complexos (Talhout *et al.*, 2003). Várias estruturas de enzimas tripsina-símile foram elucidadas em complexos com inibidores sintéticos análogos a benzamidina (Perilo *et al.*, 2010).

O isotionato de pentamidina [1, 5-bis (4-amidinofenoxi) pentano], uma diamidina aromática, é uma droga não-peptídica desenvolvida como agente anti-protozoário em 1940 para utilização no tratamento de doenças como a doença do sono Africano e kala-azar indiano causada por tripanossomas. Embora produza reações adversas geralmente graves, o fármaco tem se mostrado muito eficaz na redução da mortalidade e morbidade causadas por esses parasitos (Parker *et al.*, 1993). A estrutura da pentamidina é formada por duas moléculas de benzamidina unidas entre si por um ligante dioxipentano, semelhante a um par de resíduos de aminoácidos básicos (arginina) em um dipeptídeo, como mostrado na figura 3.

Atualmente, a pentamidina é o princípio ativo da droga Pentacarinat[®] usada no tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP) uma infecção oportunista comum e potencialmente fatal apresentada por pacientes que sofrem da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Hildebrandt *et al.*, 1998). O fármaco também é utilizado em tratamentos da leishmaniose causada por *Trypanosoma brucei gambiense* (Kobayashi *et al.*, 2010). Embora o tratamento desses parasitas com o fármaco tenha a duração de três semanas e a profilaxia possa se estender por nove meses, o uso da pentamidina era feito até a década de 80, sem o conhecimento de muitos de seus efeitos potenciais em longo prazo sobre o hospedeiro. Nesse sentido, trabalhos com linfoblastóides e hepatócitos humanos mostraram que a pentamidina não apresenta atividade mutagênica ou clastogênica, além de não afetar a viabilidade celular em baixas concentrações. No entanto, a administração prolongada do

fármaco diminuiu a taxa de crescimento e alterou a morfologia de hepatócitos (Connor & Trizna, 1992; Parker *et al.*, 1993).

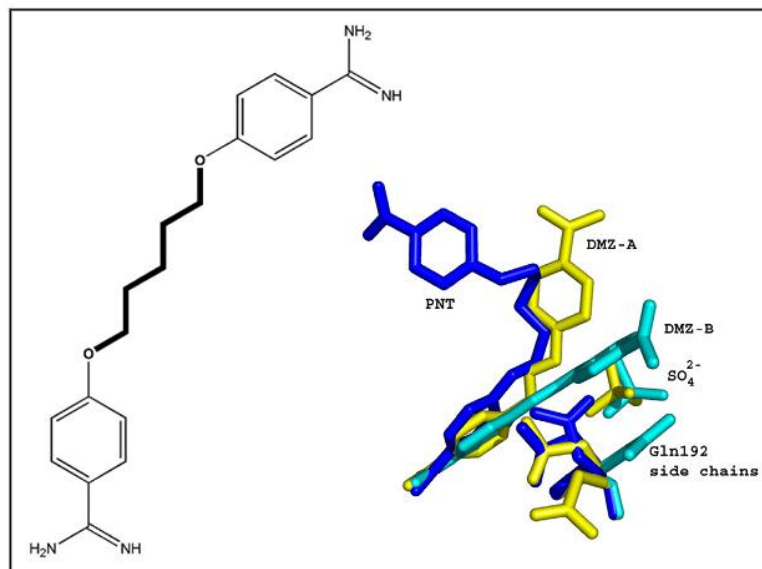


Figura 3: Estrutura química da pentamidina (à esquerda) e ligação do fármaco e de outros derivados da benzamidina ao sítio ativo da β -tripsina bovina (à direita), com as múltiplas conformações adotadas pela cadeia lateral da Glutamina (Gln192): -tripsina/pentamidina (azul escuro), -tripsina/diminazeno-A (amarelo) e -tripsina/diminazeno-B (azul claro). Adaptado de Perilo *et al.*, 2010.

Quanto à via de administração da pentamidina, no caso do tratamento e profilaxia da PCP em pacientes com AIDS, sua inalação tem se mostrado mais eficiente e menos danosa do que sua administração parenteral (Selik *et al.*, 1987). Além da diminuição da toxicidade, a pentamidina inalada atinge concentrações muito maiores na superfície bronquioalveolar com mínima absorção e nenhum efeito sistêmico significativo (Monk & Benfield, 1990).

Grande parte dos efeitos provenientes da administração de pentamidina é devido a sua capacidade de se ligar ao sulco menor do DNA e inibir a replicação e a síntese de proteínas (Hildebrandt *et al.*, 1998). Por outro lado, alguns estudos apontam sua ação direta sobre enzimas envolvidas na reparação de danos no DNA, e ressaltam a possibilidade do seu uso como agente anticancerígeno. Chow e colaboradores (2004) mostraram o efeito negativo da pentamidina sobre a viabilidade de diferentes linhagens de células tumorais e atribuíram esse fenômeno à inibição da enzima endo-exonuclease, a qual é responsável pelo reparo de danos na dupla fita de DNA e é expressa em um nível oitenta vezes maior em células tumorais. A pentamidina também se mostrou efetiva na inibição de outras proteínas envolvidas no sistema

de reparação do DNA, diminuindo a eficiência da formação e da atividade do complexo de reparo por meio da inibição de enzimas envolvidas na acetilação de histonas e clivagem de regiões alteradas do DNA (Kobayashi *et al.*, 2010). Ainda no que tange acerca de seus efeitos sobre células cancerígenas, o fármaco pode prevenir a diferenciação precoce de células de leucemia mielóide humana em cultura (Klemes *et al.*, 1984).

Além da interação com enzimas envolvidas no processamento de DNA, a pentamidina, assim como alguns de seus derivados, apresenta atividade antiproteolítica, especialmente sobre proteases tripsina-símiles (Pućkowska *et al.*, 2008). Essa capacidade de inibição seria uma das explicações para as propriedades anti-inflamatórias do fármaco, como discutido por Rosenthal e colaboradores (1991). Os autores relatam que a pentamidina regula a interleucina pró-inflamatória IL-1 de maneira pós-traducional, por meio da inibição da clivagem intracelular de seu precursor, impedindo a ação de alguma protease sobre esse.

1.4. Restrição conformacional de peptídeos

A maioria dos processos bioquímicos depende do reconhecimento molecular específico entre peptídeos ou proteínas e outras moléculas biologicamente ativas. Apesar de seus efeitos biológicos, os peptídeos podem ser rapidamente hidrolisados em presença das proteases em nosso organismo, apresentando então, baixa atividade quando administrados por via oral e/ou plasmática. Outras características relacionadas à dificuldade de transporte, excreção rápida pelo fígado ou rins e baixa seletividade, podem também dificultar sua utilização em terapêutica (Fear *et al.*, 2007). Estes fatores têm impulsionado a realização de estudos que visam desenvolver análogos de peptídeos biologicamente ativos com propriedades físicas e químicas capazes de aumentar os seus potenciais de ação, além de alterar suas estabilidades frente à proteases (Machado *et al.*, 2004).

Alguns peptídeos assumem suas conformações ativas à medida que são biossintetizados e liberados dos ribossomos ou mesmo, em alguns casos, com o auxílio de chaperonas (Ellis, 1994). Entretanto, a maioria dos peptídeos biologicamente ativos apresenta grande flexibilidade conformacional em soluções aquosas, assumindo suas conformações ativas somente quando em presença de seus receptores (Schwizer, 1995). Nesse sentido, a flexibilidade conformacional é uma vantagem, mas ao mesmo tempo pode ser considerada um fator limitante de sua atividade.

Esta flexibilidade está ligada às possibilidades de rotação das ligações simples de cada resíduo de aminoácido da cadeia peptídica. A restrição conformacional pode ser utilizada em estudos de relação estrutura-atividade e a fixação de uma, ou várias zonas do ligante, minimiza o número de conformações da seqüência peptídica, limitando o grau de liberdade dos ângulos de torção ϕ e ψ . Essa diminuição do número de conformações pode ser obtida pela ciclização entre os resíduos (Kiyota, 2000). Outra alternativa é a incorporação de restritores conformacionais, tais como ligações duplas, substituição dos constituintes da seqüência peptídica por outros aminoácidos, ou ainda a coordenação com metais (Kato *et al.*, 2009). A otimização dessas características fortalece a possibilidade do uso terapêutico de peptídeos biologicamente ativos, podendo melhorar sua biodisponibilidade e suas características farmacodinâmicas. Desse modo, o desenho e a síntese de peptídeos modificados apresentam-se como uma ferramenta poderosa para o aperfeiçoamento de inibidores naturais.

Dentro desse contexto, a coordenação com metais se mostra uma interessante alternativa para a estabilização de peptídeos sintéticos, com base no fato que íons metálicos são quelados por ligantes orgânicos ou inorgânicos através de interações freqüentemente fortes, seletivas e reversíveis (Winge, 2007). Além disso, complexos metal-ligantes abrangem uma variedade de geometrias de coordenação que lhes dão formas únicas, em comparação com outras moléculas orgânicas, bem como propriedades termodinâmicas e cinéticas particulares (Haas & Franz, 2009). Essa interação metal-ligante propicia que íons metálicos auxiliem na estabilização estrutural de proteínas e ácidos nucleicos, entre outras funções importantes, sendo muitas dessas desempenhadas pelo íon Zn^{2+} .

O zinco é um dos mais abundantes metais de transição, podendo desempenhar papel estrutural, regulatório ou catalítico em proteínas. O Zn (II) estabiliza domínios proteicos, sendo considerado um análogo inorgânico das pontes dissulfeto no ambiente redutor do citosol (Giedroc *et al.*, 1986). Evidências sugerem que complexos de Zn (II) estrutural tetratiolados (S4) em proteínas podem também desempenhar papel regulador através de oxidação reversível dos resíduos de cisteína coordenados e deslocamento do Zn (II) ligado (Ma *et al.*, 2009).

Várias proteínas que interagem com zinco estão envolvidas na replicação do DNA, glicólise, regulação do pH e na biossíntese de aminoácidos (Riccardi *et al.*, 2008). Assim, como discutido acima, a estrutura de pequenos domínios proteicos é geralmente estabilizada

pela formação de pontes dissulfeto ou pela interação com íons metálicos, sendo mais comum, a interação com o zinco. A ligação deste metal aumenta a estabilidade térmica e conformacional destes pequenos domínios, sem envolvê-lo diretamente na função. Entre tais domínios, o mais bem estudado é o motivo denominado dedo de zinco (Klug & Schwabe, 1995).

1.5. Proteínas com motivos do tipo dedo de zinco

Primeiramente identificadas no fator de transcrição IIIA de *Xenopus Laevis* (Miller *et al.*, 1985), as proteínas com motivos do tipo dedo de zinco estão entre as mais abundantes nos genomas eucarióticos (Laity *et al.*, 2001). Tais proteínas apareceram durante a evolução dos eucariotos, possivelmente como forma de regulação da homeostase intracelular de zinco (Berg & Sun, 1996). Além disso, análises genômicas mostram que a proporção de seqüências de proteínas com dedo de zinco codificadas aumenta com a complexidade do genoma. Em humanos, as estimativas mais recentes propõem que cerca de 3% dos genes codifiquem esse tipo de proteínas (Mackay & Crossley, 1998; Lander *et al.*, 2001).

O motivo peptídico dedo de zinco compreende uma estrutura terciária estabilizada pela coordenação com o íon Zn^{2+} (Klug & Schwabe, 1995), o qual pode interagir com diferentes combinações de grupos tiol de resíduos de cisteína e grupos imidazol de resíduos de histidina. Em sua estrutura natural, os motivos dedo de zinco apresentam como ligantes duas cisteínas e duas histidinas (C2H2), três cisteínas e uma histidina (C3H) ou apenas cisteínas (C4) (Iuchi, 2001). Independente dos resíduos presentes no sítio de coordenação, todos os tipos de motivos dedo de zinco apresentam geometria tetraédrica e há no mínimo dois grupos $-SH$ coordenados com o $Zn(II)$.

Depois da descoberta e caracterização do motivo C2H2, várias outras classes de domínios ligantes de zinco foram descritos e o termo dedo de zinco passou a ser empregado para designar qualquer motivo proteico que liga um ou mais íons zinco. Embora originalmente classificadas de acordo com a identidade e geometria dos ligantes de zinco (Mackay & Crossley, 1998), o crescente número de proteínas descobertas sugere que a classificação deva ser baseada em propriedades estruturais. Usando esse método, as classes de proteínas dedo de zinco são agrupadas em oito tipos diferentes de acordo com sua conformação (Krishna *et al.*, 2003). No entanto, a maioria dos dedos de zinco pertence a dois

padrões de dobramento estrutural: o clássico C2H2-símile e o clave de sol (Figura 4). (Grishin, 2001; Krishna *et al.*, 2003).

O grupo C2H2 é caracterizado pela sequência consenso (F/Y)-X-C-X2-5-C-X3-(F/Y)-X5-Ψ-X2-H-X3-4-H, onde X é qualquer resíduo de aminoácido e Ψ é qualquer resíduo hidrofóbico (Sugiura, 2001). O dedo de zinco C2H2 configura uma estrutura globular compacta que contém uma folha β e uma hélice-α mantidas unidas pelo íon Zn central, de modo que as duas cisteínas localizam-se na região folha β, e as duas histidinas na região α-hélice (Iuchi, 2001).

Todas as proteínas com motivos dedo de zinco se ligam aos íons zinco de maneira estrutural ao invés de empregá-los em processos catalíticos (Matthews & Sunde, 2002). Assim, a estabilidade conformacional conferida por esse motivo propicia a interação entre diferentes domínios proteicos e demais biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas, ligação com lipídios e seu envolvimento como co-fatores em processos enzimáticos (Mörking *et al.*, 2012).

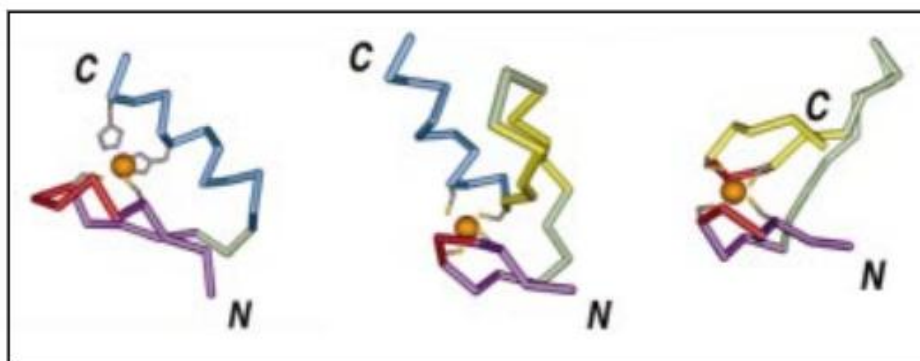


Figura 4: Classificação estrutural dos motivos dedos de zinco. As estruturas são agrupadas em oito grupos baseados nas propriedades estruturais ao redor do sítio de ligação ao zinco, sendo três as mais comuns: C2H2-símile (esquerda), clave de sol (centro) e fita de zinco (direita). Adaptado de Krishna *et al.*, 2003.

A interação do tipo proteína-DNA, envolve os domínios dos grupos C2H2-símile e clava de sol, e é realizada pela cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos das α-hélices, que se ligam à molécula de DNA. Interações adicionais com o esqueleto de fosfato e entre os dedos de zinco adjacentes, contribuem para a afinidade (Alberts *et al.*, 1998). Cada dedo de zinco se liga de maneira antiparalela a um sítio de três bases no sulco maior do DNA (Iuchi, 2001). As interações são realizadas por aminoácidos presentes nas α-hélices e *loops* dos

dedos, envolvendo principalmente os aminoácidos -1, 2, 3, e 6, numerados de acordo com o início de cada α -hélice (Figura 5) (Elrod-Erickson *et al.*, 1998).

Dedos de zinco do tipo C2H2 também podem mediar ligações proteína-proteína (Mackay & Crossley, 1998), por meio da interação com classes de dedos de zinco ou outros motivos proteicos (Matthews & Sunde, 2002). Como exemplo, a proteína REST (fator de silenciamento da transcrição do elemento repressor 1) liga-se especificamente à proteína co-repressora CoREST por meio de um dedo de zinco C₂H₂ (Andres *et al.*, 1999). A proteína WT1 (tumor de Wilms 1) também faz uso de um motivo dedo de zinco clássico para interagir com diferentes classes de proteínas, entre as quais está a p53 (Lee & Haber, 2001). Além disso, domínios proteicos contendo dois motivos dedos de zinco foram encontrados em várias proteínas e interagem diretamente com a proteína quinase C (PKC) (Kuroda *et al.*, 1996).

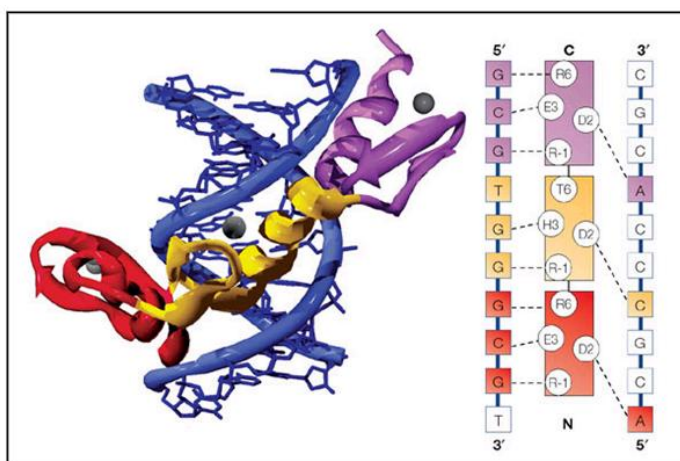


Figura 5: Esquema das interações entre aminoácidos e bases no DNA no reconhecimento de um sítio de ligação por uma proteína com motivos dedos de zinco.

O estudo da estrutura desses motivos poderia facilitar o entendimento sobre as interações proteína-proteína mediadas por dedos de zinco. No entanto, entre os motivos C₂H₂ envolvidos nesses processos, poucos são os que têm sua estrutura resolvida e nenhuma dessas mostra o dedo de zinco mediando a interação proteína-proteína. Exemplos incluem o domínio de transativação de ATF-2 e o domínio de dimerização do fator de transcrição Eos, todos contendo apenas um motivo C₂H₂ (Westman *et al.*, 2004).

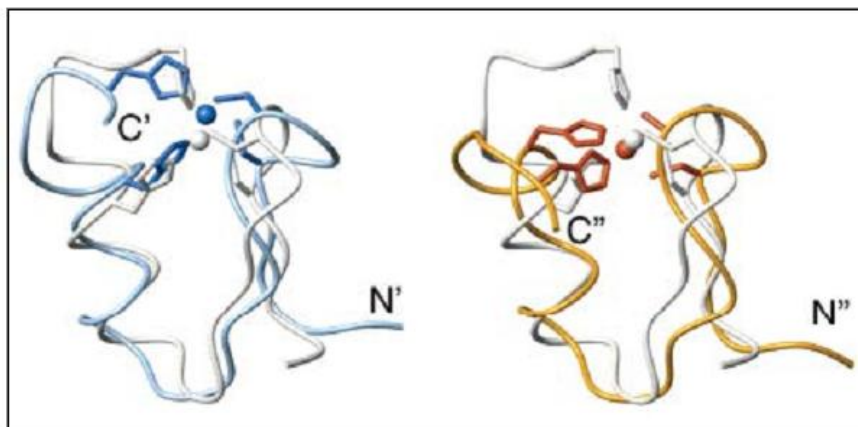


Figura 6: Comparação estrutural do motivo dedo de zinco em Eos com o motivo dedo de zinco de uma ligação ao DNA. As estruturas dos dois conformeros EosC2' (azul) e EosC2'' (amarelo), referentes ao segundo C-terminal do dedo de zinco C2H2 são mostradas superpostas ao dedo de zinco da MBP-1 (branco). As cadeias laterais dos resíduos ligadores de zinco são mostradas em bolas e linhas em azul escuro (para EosC2'), vermelho (para EosC2'') e branco (para MBP-1). O íon zinco é mostrado como esfera colorida. Adaptada de Westman *et al.*, 2004.

A análise dessas estruturas permite inferir que o dobramento desses dedos de zinco C2H2 se assemelha à estrutura $\beta\beta$ típica dos dedos de zinco que se ligam ao DNA. Desse modo, as propriedades que determinam a afinidade de alguns dedos de zinco por proteínas seriam a mudança em alguns resíduos do domínio e a distribuição de carga na superfície desse, a qual é positiva no caso dos dedo de zinco que interagem com a cadeia de fosfato do DNA e negativa ou neutra para aqueles com afinidade por proteínas. Essa variação da carga (entre neutra e negativa) sugere maior complexidade para as interações dedo de zinco-proteína, do que para as interações dedo de zinco-DNA (Westman *et al.*, 2004).

1.6. Angiogênese

Novos vasos sanguíneos são formados quando células endoteliais e musculares lisas - que formam o revestimento interno e externo dos vasos - crescem em resposta a fatores ou sinais específicos (Auerbach *et al.*, 2003). A angiogênese, ou neovascularização, é um processo complexo que envolve ativação, adesão, proliferação e transmigração de células endoteliais, levando à formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (Figura 7) (Risau, 1997). As células endoteliais devem primeiro escapar da sua localização estável

através da ruptura da membrana basal e migrar em direção a um estímulo angiogênico, tal como o que pode ser liberado a partir de células tumorais, linfócitos ativados, ou macrófagos associados a feridas (Carmeliet, 2000).

Dentro desse contexto, existe ainda a vasculogênese, processo no qual os precursores das células endoteliais, denominados angioblastos, surgem no mesoderma da vesícula vitelínica e organizam-se em agregados celulares ou ilhotas sanguíneas, diferenciando-se em uma rede vascular primordial. Posteriormente, durante a angiogênese, ocorre uma remodelagem da vascularização primária e novos capilares surgem a partir dos vasos primordiais, organizando uma rede vascular estável e complexa, com vasos sanguíneos de tamanhos diferentes (Tobelem, 1990).

Podem ser descritos dois mecanismos distintos de angiogênese: brotamento (Risau, 1997) e intussuscepção (Patan *et al.*, 1996). A angiogênese por brotamento consiste na proliferação das células endoteliais e formação de um broto de células endoteliais conectado ao vaso de origem. A intussuscepção refere-se ao processo pelo qual um único capilar divide-se longitudinalmente em dois pela formação de um septo (Figura 7).

A angiogênese é um evento essencial para o desenvolvimento normal dos tecidos e homeostase do organismo (Folkman, 2007). Em circunstâncias normais, a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante processos inflamatórios e outros fenômenos fisiológicos como a cicatrização de feridas, a regeneração de órgãos, e no sistema reprodutor feminino, durante a maturação do folículo ovariano, formação do corpo lúteo e regeneração do endométrio após o ciclo menstrual. Em tais situações, esse processo é mantido por um equilíbrio entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, garantindo que a neovascularização ocorra de maneira regulada. Os vasos sanguíneos são quiescentes e as células secretam geralmente baixos níveis de indutores e níveis elevados de inibidores (Karamysheva, 2008).

Por outro lado, na angiogênese patológica, o desequilíbrio entre os fatores angiogênicos provoca uma multiplicação descontrolada que culmina com a formação de vasos sanguíneos estruturalmente e funcionalmente desordenados (Hasina & Lingen, 2001). Essa angiogênese desregulada é um fator importante em vários processos patológicos, como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, retinopatia diabética, obesidade, aterosclerose, isquemia e osteoporose (Hoeben *et al.*, 2004).

Os mecanismos de inibição da angiogênese *in vivo* ainda não foram completamente elucidados, mas podem envolver apoptose celular, inibição da sinalização dos receptores dos fatores de crescimento ou da expressão e/ou ativação das metaloproteinases (Benelli *et al.*, 2002). Os fatores angiogênicos comumente encontrados nas neoplasias malignas são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento do fibroblasto básico (bFGF) (Karamysheva, 2008).

Entre os fatores angiostáticos, encontra-se a trombospondina-1, que inibi a proliferação e a migração das células endoteliais, sendo sua expressão negativamente regulada na tumorogênese (Tsuztnski & Nicosia, 1996). Dois outros inibidores naturais são a angiostatina e endostatina, produzidos pelas próprias células tumorais e gerados por proteólise de precursores circulantes inativos de plasminogênio e colágeno XVIII, respectivamente (Poon *et al.*, 2003).

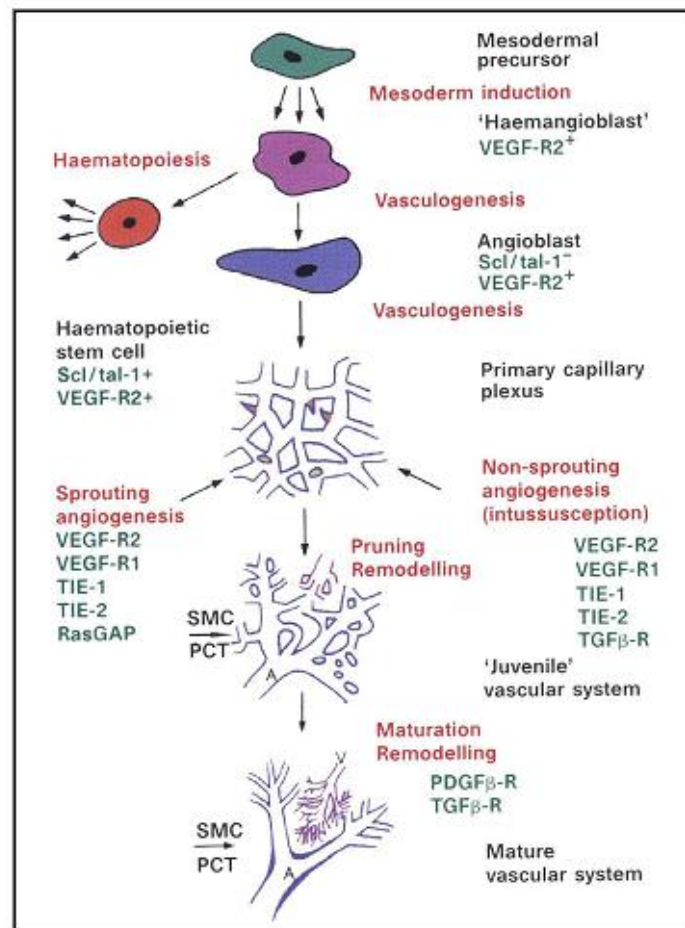


Figura 7: Etapas da angiogênese. O esquema mostra os tipos de angiogênese: brotamento, o mais frequente, intussuscepção e pontes trans-endoteliais, e o recrutamento de células progenitoras (EPCs) da medula óssea. Retirado de Risau (1997).

1.6.1. Angiogênese no câncer

O conceito de que o crescimento de tumores e metástases é dependente do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi formulado por Folkman e colaboradores na década de 70 (Folkman, 1990). A vasculatura insuficiente no sítio tumoral cria um ambiente de hipóxia que induz a expressão gênica levando à angiogênese, a qual é responsável pela efusão de oxigênio e nutrientes, e remoção de metabólitos tóxicos das células neoplásicas em proliferação. Além disso, estabelece condições favoráveis para a disseminação metastática, já que à medida que ocorre a expansão da vascularização, observa-se um aumento da superfície para o escape de células tumorais para a circulação (Karamysheva, 2008).

Durante a progressão tumoral, as mudanças ambientais e genéticas induzem uma "troca angiogênica" com uma regulação positiva de fatores angiogênicos ou baixa regulação de inibidores (Poon *et al.*, 2003). Sinais fisiológicos que podem desencadear a angiogênese incluem a hipóxia, mudança no pH, estresse metabólico e citocinas derivadas de resposta inflamatória (Auerbach *et al.*, 2003). Esse fenômeno demarca dois estágios do crescimento tumoral: a fase pré-vascular - relacionada a um crescimento tumoral lento, com pouca ou nenhuma metástase - e a fase vascular, na qual o tumor tem um crescimento rápido e grande potencial metastático, sendo geralmente sintomático e clinicamente detectável (Folkman, 1995).

Desse modo, a angiogênese é um alvo potencial para a quimioterapia anti-cancer. Estudos recentes indicam que as proteases participam de praticamente todos os passos do crescimento tumoral, inclusive do processo metastático (Nyberg *et al.*, 2006).

1.6.2. Avaliação da atividade angiogênica

A regulação da angiogênese pode ter muitas aplicações clínicas e na pesquisa. Por exemplo, a regulação negativa da angiogênese seria vantajosa durante períodos de crescimento neoplásico e inflamação crônica (Schweigerer & Fotsis, 1992); por outro lado, uma regulação positiva seria importante para facilitar o estabelecimento de transplantes e na regeneração tecidual (Arnold & West, 1991).

Ensaios de angiogênese são usados para testar a eficácia de agentes pro- e anti-angiogênicos, baseados em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. Existem vários métodos em uso:

ensaios de neovascularização da córnea, ensaio *in vivo* e *in vitro* da membrana corioalantóica de galinha (CAM – *corioalantoic membrane assay*), e um grupo de ensaios que usam implantes de esponjas contendo células ou substâncias a serem testadas, os quais correspondem a uma angiogênese inflamatória. Os ensaios *in vitro* englobam avaliação da proliferação, migração e formação de tubo (realizados em cultura de células) e de anel aórtico (cultura de órgãos) (Auerbach *et al.*, 2003).

O ensaio com a membrana corioalantóide de galinha (CAM) *in vivo* é um dos testes mais utilizados, em parte, devido ao seu baixo custo, facilidade e simplicidade de execução, prestando-se como triagem de larga escala (Auerbach *et al.*, 2003).

A membrana corioalantóica embrionária de galinha é uma membrana extra-embrionária formada por uma fusão da mesoderme com a ecdoterme coriônica, que se encontra abaixo da membrana da casca, no quarto dia do desenvolvimento embrionário (Hamilton, 1965). Sua expansão progressiva, que inclui a angiogênese microvascular, atende às exigências de oxigênio do embrião em desenvolvimento, mediando as trocas gasosas com o ambiente extraembrionário até o momento da eclosão. Tal expansão da microcirculação é caracterizada pela proliferação de células endoteliais, sendo temporalmente correlacionada com a expressão de FGF no fluido corioalantóico. Devido a este fato, a CAM tem uma rede capilar muito espessa, que forma uma superfície contínua em contato direto com a casca. Durante o período normal de incubação de 21 dias de embriões de galinha, ocorre um aumento na taxa de angiogênese na membrana durante o décimo dia, quando o índice mitótico então declina rapidamente, e o sistema vascular atinge a sua disposição final ao décimo oitavo dia, bem antes da eclosão (Missirlis *et al.*, 1990).

A principal desvantagem do ensaio da CAM é que ela já contém uma rede vascular bem desenvolvida e por si só sofre mudanças rápidas tanto em sua morfologia quanto na velocidade da proliferação de células endoteliais durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, os ensaios são executados em aves, podendo limitar o aproveitamento integral desses resultados em mamíferos. No entanto, o modelo é considerado válido pela literatura contemporânea para testes acerca da atividade angiogênica de diversas substâncias como esteróides, heparina, anti-cancerígenos e antagonistas de moléculas de adesão, sendo crescentes os trabalhos publicados nessa área (Katrancioglu *et al.*, 2012).

2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que os inibidores de protease do tipo Bowman Birk (BBI) representam uma importante alternativa na prevenção do câncer induzido quimicamente e por radiação, tornam-se relevantes estudos que utilizem diferentes formas desses inibidores. Além disso, por ser uma doença de caráter multifatorial, o desenvolvimento do câncer está ligado à desregulação de diversos processos fisiológicos, como expressão e atividade de serino-proteases e angiogênese.

Muitos trabalhos mostram que a atividade anti-carcinogênica do BBI – bem como suas alças inibitórias isoladas – está ligada à modulação da atividade proteásica, em especial das enzimas tripsina, quimotripsina e do proteassoma (Clemente *et al.*, 2011). Apesar de suas propriedades, o uso desses inibidores é restringido por sua estabilidade e biodisponibilidade limitadas. Para contornar esse fato, vários estudos buscam métodos para a estabilização desses inibidores e de seus derivados, visando aumentar o potencial de aplicação clínica desses.

Desse modo, esse trabalho propõe a construção, por meio de síntese química, das alças inibitórias do BBI estabilizadas por motivos dedo de zinco. A técnica empregada para a produção dos inibidores é amplamente utilizada para a síntese de polipeptídeos pequenos e permite não só a otimização das características das moléculas estudadas – através de mutações pontuais na sequência de resíduos – como também a fusão de diferentes sequências de aminoácidos. Com isso, a união das propriedades bioativas do BBI à estabilidade esperada por motivos dedo de zinco pode dar origem à inibidores com maior estabilidade para testes em modelos biológicos, como a regulação da angiogênese e da atividade inibitória sobre proteases fisiologicamente importantes.

3. *Objetivos*

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Sintetizar peptídeos baseados nas cabeças inibitórias do tipo Bowman-Birk, estabilizados por motivos dedo de zinco, e avaliar a atividade desses na regulação da angiogênese.

3.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar e purificar peptídeos análogos às cabeças inibitórias antitripsina e antiqumotripsina do inibidor Bowman-Birk;
2. Sintetizar e purificar peptídeos correspondentes a estes dois domínios inibitórios com sequencia modificada para conter sítios de coordenação com o íon zinco;
3. Avaliar a atividade inibitória sobre tripsina e quimotripsina e estabilidade dos inibidores quando complexados com Zn^{2+} ;
4. Avaliar a capacidade dos peptídeos sintéticos quanto à inibição do proteassoma de Ratos Wistar;
5. Analisar o efeito angiogênico dos inibidores em membrana corioalantóica de *Gallus gallus domesticus*.

4. Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto e catalogado sob o protocolo nº 2012/50.

Para realização dos ensaios foram utilizados concentrados de BBI de soja (BBI-E), produzidos em nosso laboratório conforme a metodologia proposta por Yavelow et al.(1985) e BBI purificado por coluna de afinidade de tripsina (BBI-PA).

4.1. Síntese dos inibidores peptídicos

Os inibidores peptídicos de tripsina e quimotripsina derivados do BBI (Tabela 1) foram sintetizados manualmente sob a forma solúvel, utilizando-se o protocolo de síntese em fase sólida estabelecido por Merrifield (1963), com algumas modificações. O processo adotado neste trabalho utiliza o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos grupos α -amino, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais. A resina empregada para o acoplamento dos aminoácidos foi a *Rink Amide Resin HL* (Merck, Alemanha) a 0,78 mmol/g, da qual se utilizou a quantidade necessária para um rendimento de 40 μ moles de peptídeo por síntese.

Tabela 1: Peptídeos sintéticos baseados nas cabeças inibitórias do BBI, suas respectivas nomenclaturas e sequências. Os resíduos envolvidos na coordenação com o zinco são mostrados em vermelho.

Peptídeo	Nomenclatura	Sequência
Cabeça inibitória de tripsina	YCT-trip	YCTKSIPPQCG
Cab. Inib. Trip.com dedo de zinco clássico	CPI-trip	CPIC TKSIPPQH LELRHY
Cab. Inib. Trip.com dedo de zinco	HPI-trip	HPIC TKSIPPQH LELRHY
Cabeça inibitória de quimotripsina	YCA-quimo	YCALSYPACG
Cab. Inib. Quimo.com dedo de zinco clássico	CPI-quimo	CPIC ALSYPAQH LELRHY
Cab. Inib. Quimo.com dedo de zinco	HPI-quimo	HPIC ALSYPAQH LELRHY

4.1.1. Ativação da resina

Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido, 40 μ moles de resina (52 mg) foram colocados em um tubo de síntese ao qual foi adicionada dimetilformamida (DMF) suficiente para cobrir toda a resina, permanecendo sob agitação constante por três horas à 37°C. Para a liberação do seu grupamento Fmoc, a resina foi coberta com 3 mL de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF e lavada três vezes, por 20 minutos cada, sob agitação contínua a temperatura de 37°C. Em seguida, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF, utilizando-se 2 mL de cada solvente por lavagem. Todas as lavagens foram realizadas com auxílio de uma bomba de vácuo.

4.1.2. Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados

Na etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi empregado um excesso molar de quatro vezes (160 μ moles), em relação à quantidade de resina inicial, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação. Os aminoácidos são ligados pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina, formando uma ligação peptídica. O primeiro aminoácido foi adicionado ao tubo de síntese em um volume de 2 mL de DMF, acrescido de 25 μ L de diisopropilcarbodiimida (DIPC) e 23 mg de acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (*oxyma pure*). O DIPC e a *oxyma pure* são reagentes que permitem a ativação da função carboxílica dos aminoácidos Fmoc. Após 2 horas de agitação à 37°C, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado, sendo então submetida a uma acetilação preventiva. A acetilação impede a continuação do crescimento das cadeias que não reagiram com o aminoácido a ser incorporado, e que, conseqüentemente, se mantêm com o grupo amino-terminal livre. Dessa forma, 50 μ L de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético foram adicionados em 1 mL de DMF ao tubo de síntese, permanecendo sob agitação à 37°C por 30 minutos. Ao fim desta etapa, a resina foi lavada três vezes alternadamente com metanol e DMF. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a incorporação de cada aminoácido, foi realizada lavando-se a resina com 3 mL de uma solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF, por três vezes de 10 minutos cada, com agitação contínua à 37°C. Os demais aminoácidos foram processados conforme descrito para o acoplamento do primeiro aminoácido.

4.1.3. Clivagem do peptídeo

Após o término dos ciclos de acoplamento, o último grupamento Fmoc foi eliminado com 4-metilpiperidina 20% em DMF, como descrito previamente, e a resina lavada por quatro vezes, durante cinco minutos, com 3 mL de diclorometano (DCM). A clivagem final, para dissociação do peptídeo da resina, e a desproteção das cadeias laterais foram efetuadas pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com 5mL de solução de clivagem contendo 95% de TFA. Para os peptídeos contendo cisteína, a solução de clivagem continha 2,5% de β -mercaptoetanol, a fim de se evitar a formação de pontes dissulfeto. O tubo de reação permaneceu sob agitação por quatro horas. A solução contendo os peptídeos foi coletada, transferida para tubos de ensaio e os produtos de síntese precipitados com 50 mL de éter etílico, permanecendo em repouso *overnight* à 4°C. Posteriormente, os precipitados foram lavados com éter etílico e centrifugados por três vezes a 1.500 g por 5 minutos. Na última etapa, o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspensionado em 3 mL de água milli-Q. Os peptídeos correspondentes às cabeças inibitórias tradicionais foram submetidos ao processo de ciclização, enquanto aqueles contendo resíduos destinados à coordenação com o íon zinco foram reduzidos para prevenir a formação de pontes dissulfeto.

4.1.4. Ciclização dos peptídeos

Para os peptídeos correspondentes às cabeças de inibição de tripsina e quimotripsina, foi utilizado o processo de ciclização que permite a oxidação e consequente formação de pontes dissulfeto entre as cadeias laterais de cisteínas. Os peptídeos liofilizados foram dissolvidos em 50 mL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 7.4, contendo 16% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos contendo as soluções foram mantidos sob agitação por 48 horas na ausência de luz e novamente submetidos ao processo de liofilização. Os peptídeos foram purificados em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e caracterizados em espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF com ionização do tipo *electrospray*.

4.1.5. Reação de redução e prevenção de formação de pontes dissulfeto

Depois de liofilizados, os peptídeos com o motivo dedo de zinco foram transferidos para frascos apropriados e incubados com um excesso molar de DTT (8 vezes) a 55°C por 2 horas em tampão Tris.HCl 10 mM, pH 7,2. Passado o período de incubação o pH da solução foi ajustado para 2,0, sob atmosfera de nitrogênio, utilizando uma solução de TFA 0,1%, e as amostras novamente liofilizadas. Este procedimento teve como objetivo quebrar e/ou evitar a formação de pontes dissulfeto que podem ocorrer inter ou intra-cadeias, o que impediria a coordenação adequada entre os resíduos de cisteína e o íon zinco. Para realização dos ensaios posteriores, o excesso de DTT foi eliminado durante o processo de purificação dos fragmentos sintetizados, empregando cromatografia de exclusão molecular em resina G-15 (Pharmacia LKB Biotechnology) de dimensões 1,0 cm x 15,0 cm equilibrada previamente com tampão Tris.HCl 10 mM, pH 7,2. Foram recolhidas manualmente 50 frações de 500 µL cada, utilizando-se o mesmo tampão de equilíbrio como eluente.

4.1.6. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida em fase reversa em sistema HPLC

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram submetidos à cromatografia de fase reversa para a análise de sua pureza. As cromatografias foram realizadas em coluna C18 (250 mm x 10 mm) (Lichrocart 250-10 Purospher-Shimadzu®), em sistema HPLC Shimadzu®. A coluna foi previamente equilibrada com uma solução de água mili-Q e TFA 0,1%. Alíquotas de todos os peptídeos (20 µL) foram eluídas em um gradiente de acetonitrila (ACN) variando de 25 a 60% em TFA 0,1% durante 30 minutos com uma vazão de 1 mL/minuto, monitorando-se a eluição a 280nm. Após a purificação, os peptídeos foram caracterizados e identificados por espectrometria de massas.

4.1.7. Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas LCMS-IT-TOF *electrospray*

Os peptídeos purificados foram analisados por espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatography Ion Trap Time Of Flight*), que opera por ionização do tipo *electrospray* (Shimadzu®). O equipamento foi calibrado utilizando trifluoroacetato de sódio. A voltagem capilar foi de 4500 V no modo positivo de ionização, com tempo de acumulação de 10 ms. As amostras foram aplicadas através de injeções diretas de alíquotas de 5 µL. Os espectros obtidos foram comparados com as massas moleculares previstas pelo software *ExPASy – Compute PI/Mw tool* (disponível em http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.1.8. Determinação das soluções estoque de peptídeo

Após a constatação da pureza, cada solução contendo os peptídeos (que possuem resíduos de tirosina em suas sequências) foi padronizada para a obtenção de dados experimentais. Foi empregado o método de Edelhoch (1967) para determinação teórica do coeficiente de extinção molar (ϵ) em λ 280 nm. Assim, tem-se:

- Método de Edelhoch para determinação da ϵ de peptídeos e proteínas:

$$\epsilon \text{ (L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de Trp}) \cdot (5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) + (\text{n}^\circ \text{ de Tyr}) \cdot (1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) + (\text{n}^\circ \text{ de Cys}) \cdot (125 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

O valor de ϵ é aplicado na equação de Lambert-Beer para determinação da concentração da amostra:

- Equação de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$

onde 'A' é a absorvância da solução de peptídeos em λ 280 nm, ' ϵ ' é a absorvidade molar calculada pelo método de Edelhoch ($\text{L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 'b' é o caminho óptico (1 cm) e 'c' a concentração (mol.L^{-1}).

4.2. Determinação de grupos sulfidrila livres nos peptídeos com motivo dedo de zinco.

Para garantir que ocorra a coordenação entre os peptídeos e o íon zinco, é necessário confirmar que os grupos sulfidrila estejam na forma reduzida. Para tanto, foi utilizado o teste de Ellman's (Bulaj *et al.*, 1998) que emprega o ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB) como reagente. Inicialmente uma solução estoque de DTNB 2mM foi preparada em acetato de sódio 50 mM pH4,0 e armazenada em refrigerador.

Para a determinação dos grupos sulfidrila livres foi construída uma curva de calibração empregando L-cisteína em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, partindo-se da concentração de 1 mM até 15 mM. Uma alíquota de 10 µL de cada uma das soluções padrão de L-cisteína foi adicionada a 990 µL de uma solução de DTNB (50 µL da solução estoque de DTNB, 100 µL de tampão Tris.HCl 1 M, pH 8,0 e 840 µL de água deionizada) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo, para leituras de absorbância a 412 nm em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® duplo feixe, utilizando como branco uma solução em que a amostra era omitida. Para os ensaios de cada uma das amostras peptídicas empregou-se o mesmo procedimento, utilizando 10 µL de uma solução contendo um dos peptídeos, de modo que a concentração final variasse de 1 a 5 mM.

4.3. Titulação com cobalto (Co²⁺)

A coordenação dos inibidores peptídicos com íons cobalto foi realizada conforme descrito por Frankel e colaboradores (1987), através de titulação por complexação e teve como finalidade a determinação da melhor razão estequiométrica para a coordenação do Zn²⁺ com os inibidores peptídicos. Como o íon Zn²⁺, quando complexado, não apresenta alterações nos espectros de absorção de luz, o íon Co²⁺ foi empregado como sonda espectroscópica. Esse procedimento permite avaliar a interação dos peptídeos com íons metálicos, pois a coordenação de íons cobalto aos grupos sulfidrila livres resulta em alterações na absorção a 310 nm e outros comprimentos de onda.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em tampão Tris.HCl 10 mM, pH 7,2, para um volume final de 300 µL. A titulação foi realizada adicionando-se alíquotas de uma solução de cloreto de cobalto na solução contendo um dos peptídeos até se observar a

mudança no espectro e atingir a estequiometria desejada. A concentração da solução estoque de CoCl_2 variou entre os ensaios e foi definida com base na concentração e no número de resíduos de cisteína dos peptídeos a serem titulados. Como branco foi utilizado o mesmo tampão empregado no preparo das amostras.

Os espectros de absorção foram traçados na faixa de 250 a 800 nm, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

4.4. Ensaios de competição com Zn^{2+}

Para verificar a complexação entre o íon zinco e os inibidores peptídicos, à solução recém titulada com cobalto foram adicionadas alíquotas de uma solução de ZnCl_2 de concentração equivalente à de CoCl_2 . Os espectros foram traçados nas mesmas condições citadas acima, até serem observadas mudanças nos espectros em relação àqueles obtidos com a titulação do íon cobalto.

4.5. Ensaios Enzimáticos

4.5.1. Atividade inibitória anti-tripsina bovina

A determinação da atividade tripsínica foi feita de acordo com Erlanger *et al.*, (1961). O substrato cromogênico usado foi o cloridrato de N- α -benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (DL-BApNA), que foi preparado dissolvendo-se 196 mg do composto em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obter a concentração de 9×10^{-2} M. Essa solução estoque foi mantida no congelador e diluída para a concentração de 9×10^{-4} M, no momento do uso, com tampão Tris-HCl 0,1 M pH8,1 contendo CaCl_2 20 mM.

Os tubos teste foram constituídos dos seguintes reagentes: DL-BApNA 200 μL , tripsina 20 μL a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 μL dos inibidores, previamente diluídas em tampão NH_4HCO_3 0,01M pH 8,5. O tubo branco foi constituído de 200 μL de substrato e 140 μL de água, enquanto que o tubo controle de atividade enzimática continha 200 μL de substrato, 20 μL de enzima e 20 μL de água.

Os tubos de reação foram homogeneizados em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C por aproximadamente 40 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 250 μL de

ácido acético 60% (v/v) e a atividade enzimática quantificada pela medida da absorbância a 410nm. Para obter medidas confiáveis da atividade inibitória, ou seja, valores de absorbância consideravelmente maiores que o ruído do equipamento, as preparações de inibidores foram previamente diluídas em série para obter inibição entre 40 e 60% da atividade da tripsina. Posteriormente, as percentagens de inibição foram multiplicadas pelo fator de diluição para a determinação atividade inibitória, e divididas pela concentração para normalização dos resultados.

4.5.2. Atividade inibitória anti-quimotripsina bovina

A determinação da atividade quimotripsínica também foi feita de acordo com Erlanger *et al* (1961). O substrato usado foi o cloridrato de *N*- α -benzoil-L-tirosil-p-nitroanilida (L-BTpNA) que foi preparado dissolvendo-se 182 mg do composto em 5 mL de DMSO para obter 9×10^{-2} M. Esta solução estoque foi mantida no congelador e diluída no momento do uso com Tris-HCl 0,1 M pH 8,1 contendo CaCl₂ 20 mM e DMSO na proporção de 80% e 20% respectivamente, para a concentração de 9×10^{-4} M.

O tubo teste foi constituído dos seguintes reagentes: L-BTpNA 200 μ L, quimotripsina 20 μ L a uma concentração de 0,05 mg/mL e 20 μ L dos inibidores, previamente diluídas em tampão NH₄HCO₃ 0,01 M pH 8,5. O tubo branco foi constituído de 200 μ L de substrato e 20 μ L de água, enquanto que o tubo controle da atividade enzimática continha 200 μ L de substrato, 20 μ L de enzima e 20 μ L de água.

Os tubos de reação foram homogeneizados e incubados em banho-maria a 37°C por aproximadamente 40 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 250 μ L de ácido acético 60% (v/v) para paralisar a reação. A atividade enzimática foi quantificada pela medida da absorbância a 410nm.

4.5.2.1. Cálculo da Atividade Inibitória (AI):

Fator de diluição de uma solução de amostra que inibiu entre 40 e 60% as enzimas, multiplicado pela porcentagem de inibição* obtida, normalizada pela concentração em mg/mL.

* $1 - (AEI/AE) \times 100$, onde:

AEI = Absorvância a 410nm do ensaio de inibição da atividade enzimática (inibidor + enzima + substrato)

AE = Absorvância a 410nm do controle do ensaio de atividade enzimática (enzima + substrato)

Os valores finais foram transformados em Unidades de Atividade Inibitória Normalizada (UAIN).

1 UAIN equivale a 1.000.000 AI.

4.5.3. Taxa de hidrólise enzimática

Para a determinação da taxa de hidrólise dos inibidores pela tripsina ou quimotripsina, cada enzima e seus respectivos inibidores foram misturados e incubados a 37°C previamente aos ensaios de atividade inibitória. Foi adicionado inibidor suficiente para inibir aproximadamente 90% da enzima. Foram retiradas alíquotas em tempos crescentes (10, 20, 30, 60, 90, 120, 135 e 180 min) e a taxa de hidrólise foi determinada analisando-se a retomada da atividade enzimática em função do tempo. O experimento foi executado a 37°C em Tris-HCl 50 mM pH 7,8 contendo CaCl₂ 10 mM, usando o substrato cromogênico DL-BApNA, como descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

4.5.4. Determinação da estabilidade térmica dos inibidores

Para avaliar a termoestabilidade dos inibidores, esses foram incubados em banho-maria à temperatura de 70°C, retirando-se alíquotas de 20µL em diferentes tempos de incubação (10, 20, 30, 60, 90, 120, 135 e 180 min). Essas alíquotas foram imediatamente resfriadas em banho de gelo e armazenadas para determinação da atividade inibitória residual (como descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2), em relação ao tempo zero.

4.5.5. Determinação da resistência dos inibidores ao ambiente redutor

Para verificar a estabilidade dos inibidores em ambiente redutor, esses foram incubados a 37°C em uma solução de ditioneitol (DTT) 10⁻⁵ M, previamente aos ensaios de

atividade inibitória. Foi adicionado inibidor suficiente para inibir aproximadamente 90% da enzima e foram retiradas alíquotas em tempos crescentes (10, 20, 30, 60, 90, 120, 135 e 180 min), determinando-se a taxa de hidrólise pela retomada da atividade enzimática em função do tempo (como descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2).

4.6. Extração de proteínas solúveis

4.6.1. Fígado de Ratos Wistar

A extração de proteínas de fígado foi realizada de acordo com um protocolo modificado de Abramova *et al.*, 2004. Aproximadamente, 5,0 g de amostras de fígado foram lavados em PBS (tampão fosfato salino) 0,1 M, pH 7,4, e homogeneizados com tampão A (Tris-HCl 30 mM pH 7,5; NaCl 100 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; MgCl₂ 5 mM; glicerol 10%) em tubo *Potter* por 10 minutos em banho de gelo (100 mg de tecido/mL de tampão A). O homogenato foi transferido para tubos de ensaio (1 mL cada) e esses sonicados por 15 segundos, três vezes a 25 *watts*, com intervalo de 45 segundos entre cada ciclo (Sonifier 250 Branson). O homogenato foi reunido e centrifugado a 2000 g por 15 minutos para remoção de debris celulares (centrífuga Sorvall 5C). O sobrenadante contendo a fração solúvel foi novamente centrifugado, desta vez a 46000 g por 140 minutos. A seguir, o sobrenadante resultante foi reunido e submetido à precipitação por sulfato de amônio a 40% (20 minutos para adição contínua do sal; 20 minutos em repouso; 20 minutos de centrifugação a 16000 x g a 4°C). O precipitado foi descartado e as proteínas presentes no sobrenadante submetidas à precipitação com sulfato de amônio a 70%, conforme descrito anteriormente. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 3 mL de tampão B (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; MgCl₂ 5 mM; glicerol 20%).

4.7. Cromatografia de filtração molecular em Fractogel® EMD BioSEC (S)

Os extratos de proteínas solúveis, pré-enriquecidos como descrito no item 4.6.1., foram submetidos à cromatografia de filtração molecular em Fractogel® EMD BioSEC (S). A coluna utilizada (dimensões: 60 x 1,5 cm) foi previamente equilibrada em tampão B (Tris-

HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; MgCl₂ 5 mM; glicerol 20%). As proteínas foram eluídas com um fluxo aproximado de 12 mL/hora e frações de 4 mL recolhidas a cada 20 minutos. O acompanhamento das eluições foi realizado em Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu® duplo feixe no comprimento de onda de 280 nm.

4.7.1. Identificação das frações enriquecidas com o proteassoma 20S pela medida da atividade quimotripsina-símile

Alíquotas de 10 µL das frações eluídas dos extratos de fígado foram ensaiadas quanto à atividade peptidásica em três diferentes condições: substrato; substrato e SDS 0,02%; substrato e MG-132 20 µM. Utilizou-se o substrato fluorogênico N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (Sigma Aldrich, EUA) para a determinação da atividade quimotripsina-símile. Inicialmente, as alíquotas das frações proteicas foram pré-incubadas a 37°C por 15 minutos em tampão 20S (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; DTT 1 mM; MgCl₂ 5 mM). Após o período de pré-incubação, o substrato foi adicionado para uma concentração final de 25 µM em um volume reacional de 125 µL. A reação permaneceu incubada por mais 1 hora, sendo interrompida pela adição de 2 mL de SDS 1%. Realizou-se a detecção fluorimétrica em espectrofluorímetro Shimadzu® RF-5301PC nos comprimentos de onda 380nm (excitação) e 440nm (emissão). As frações que possuíam maior quantidade de proteassoma 20S, ou seja, frações ativadas pelo SDS 0,02% e inibidas pelo MG-132, foram então agrupadas para os ensaios de atividade proteolítica com os inibidores sintetizados. A determinação da concentração proteica destas frações foi realizada utilizando-se o método do BCA (Smith *et al.*, 1985) (Thermo Scientif, EUA), segundo recomendações do fabricante.

4.8. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Cerca de 10 µg das frações enriquecidas com proteassoma 20S provenientes da cromatografia de filtração molecular foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970), utilizando géis de separação a 10% e géis de concentração a 5% em condições desnaturantes. As amostras foram diluídas (1:1) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20%, azul de bromofenol 0,002%) e submetidas a banho de água fervente por 5

minutos para desnaturação das proteínas. Utilizou-se como padrão de peso molecular o *Molecular Weight Marker Kit* (Sigma Aldrich, EUA). A amperagem adotada foi de 20 mA por gel. Após a corrida em tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 M e SDS 0,1%, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,025% em 40% de etanol e 7% de ácido acético.

4.9. Avaliação das atividades peptidásicas do proteossoma na presença de inibidores

As atividades proteolíticas semelhantes à tripsina e quimotripsina das frações enriquecidas com proteossoma 20S da espécie estudada foram analisadas na presença dos inibidores propostos. Os substratos fluorogênicos Boc-Val-Pro-Arg-7-amido-4-metilcumarina e N-Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (Sigma Aldrich, EUA) foram utilizados para a determinação das atividades tripsina- e quimotripsina-símile, respectivamente. Para cada reação, utilizou-se entre 5 e 20 µg de proteínas. As alíquotas das frações proteicas foram pré-incubadas a 37°C por 15 minutos em tampão 20S juntamente com 1 µM de cada inibidor. Em seguida, a reação foi iniciada pela adição de 25 µM do substrato fluorogênico e do ativador SDS 0,02% em um volume reacional de 125 µL, sendo interrompida após 1 hora com 2 mL de SDS a 1%. A detecção fluorimétrica foi realizada em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda 380nm (excitação) e 440nm (emissão). Determinou-se a concentração dos peptídeos conforme descrito no item 4.1.8. As medidas de fluorescência foram realizadas em quintuplicata para cada inibidor e os resultados expressos pela atividade inibitória em relação à obtida em um grupo controle na ausência de inibidores.

4.10. Ensaio de angiogênese em membrana corioalantóica de *Gallus gallus domesticus*

A atividade angiogênica dos inibidores foi avaliada empregando o ensaio da membrana corioalantóica de galinha (CAM) descrito por Auerbach e colaboradores em 1974.

Ovos de galinha embrionados foram obtidos no comércio local e sua superfície higienizada com auxílio de uma esponja seca para remoção de quaisquer dejetos presentes. Os ovos foram incubados em chocadeira Brasmatic® à 37°C, com 60% de umidade e viragem automática dos ovos a cada quinze minutos. No oitavo dia de incubação foi aberto um orifício

na região inferior do ovo (região correspondente ao saco aéreo) com o auxílio de agulha estéril. Neste local foram instilados 7 μ L da substância a ser testada, por um período de cinco dias consecutivos. No décimo quarto dia de incubação os embriões foram anestesiados utilizando uma associação de xilasina/quetamina (1:1) e posteriormente sacrificados por seccionamento cervical. As membranas corioalantóicas foram removidas e fotografadas em microscópio digital (Vimicro corp.).

4.10.1. Quantificação do número de bifurcações dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóica

Após o registro das imagens, as mesmas foram analisadas com auxílio do software Adobe Photoshop®, sendo divididas em quadrantes de 0,5 cm². Foram escolhidos aleatoriamente 10 quadrantes (representando aproximadamente 10% da área total da imagem) e as bifurcações dos vasos sanguíneos foram quantificadas. Como critério de exclusão, foram eliminados os quadrantes apresentando artefatos, vasos de calibre superior a três milímetros, preenchimento incompleto do quadrante, ou ainda áreas com baixa resolução.

4.11. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o *software Graph Pad Prism* (Versão 5.0). Para os dados que não assumem a distribuição gaussiana utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunns*. Para os dados que assumem a curva gaussiana, empregou-se o teste ANOVA *one-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Adotou-se o nível de significância $p \leq 0,05$ para todas as análises.

5. Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Planejamento dos peptídeos inibidores análogos ao BBI

Estudos prévios realizados em nosso laboratório (Santos, 2006) e resultados da literatura (Billings *et al.*, 1992) demonstraram que, apesar de seus efeitos biológicos *in vivo*, inibidores Bowman-Birk obtidos da soja e da semente de *Macrotyloma axillare* apresentaram distribuição limitada no organismo e baixa difusão tecidual. Como alternativa ao uso do BBI em sua forma nativa, os domínios inibitórios sintéticos, os quais retêm a estrutura tridimensional original da molécula, podem ser utilizados em estudos farmacológicos (Song *et al.*, 2008). No entanto, tais peptídeos sintéticos apresentaram baixa biodisponibilidade (apenas 5%), possivelmente devido à susceptibilidade à degradação (Amorin, 2009). Dessa forma, a síntese de peptídeos com maior estabilidade e que conservem a atividade biológica dos homólogos naturais seria uma alternativa interessante para aumentar a meia-vida de peptídeos derivados do BBI em sistemas biológicos.

Para conferir maior estabilidade às cabeças inibitórias sintéticas do BBI, aminoácidos correspondentes ao motivo proteico do tipo dedo de zinco foram adicionados nas extremidades do *loop* de inibição. A escolha desse motivo foi baseada na sua função estabilizadora em diversas proteínas envolvidas em diferentes processos celulares (Negi *et al.*, 2004).

A grande maioria dos estudos realizados com inibidores do tipo Bowman-Birk emprega o inibidor encontrado na soja, porém estudos relatam um alto nível de homologia das sequências, bem como similaridade de estrutura e propriedades físico-químicas, entre os inibidores de soja e de outras plantas, como aqueles obtidos de *Macrotyloma axillare* (Joubert *et al.*, 1979). Além disso, como observado em trabalhos prévios do nosso grupo, o inibidor de sementes germinadas de *Macrotyloma axillare* apresenta melhor atividade inibitória sobre tripsina do que os inibidores de soja (Oliveira, 2004). Por outro lado, o domínio inibitório de quimotripsina de soja é mais eficiente. Assim, foram propostas estruturas baseadas na sequência do inibidor de tripsina da planta *Macrotyloma axillare* e na sequência do inibidor de quimotripsina de soja.

Nishino e colaboradores (1977) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que um peptídeo monocíclico, composto por nove resíduos, baseado no domínio de ligação à tripsina foi suficiente para preservar as propriedades inibitórias do inibidor nativo. Gariani e colaboradores (1999) estudaram os efeitos na variação dos resíduos de aminoácidos em P2', a partir da comparação de 21 peptídeos sintéticos inibidores de tripsina. Variações no resíduo P2' de peptídeos sintéticos promoveram alterações significativas na constante de inibição, confirmando a grande influência desta posição na interação com a enzima. A substituição na posição P2' pelo aminoácido isoleucina resulta em um valor baixo da constante de inibição e diminui a taxa de hidrólise dos inibidores (Gariani e *et al.*, 1999).

Desse modo, o peptídeo antitripsina YCTKSIPPQCG (YCT-trip), contendo o aminoácido isoleucina na posição P2', como descrito por Gariani e colaboradores (1999), e o peptídeo YCALSYPAQCG (YCA-quimo) com atividade anti-quimotripsina descrito por McBride e colaboradores (1996) foram escolhidos para a síntese. Quanto aos peptídeos contendo sítios de coordenação com o íon zinco, as sequências foram desenhadas baseadas na estrutura proposta por Iuchi & Kuldell (2005) para que um íon Zn^{2+} possa se coordenar a dois resíduos de cisteína e dois resíduos de histidina (Cys-1, Cys-4, His-12 e His-17), como encontrado na estrutura clássica de dedos de zinco, ou a um resíduo de cisteína e três de histidina, uma estrutura não encontrada naturalmente e descrita por Negi e colaboradores (2004). A representação dos peptídeos é mostrada na figura 8. A introdução desse motivo foi acompanhada da expectativa de que a estrutura tridimensional do domínio inibitório fosse preservada para permitir a interação com as enzimas tripsina e quimotripsina.

A presença do aminoácido cisteína na região C-terminal prejudica o rendimento da síntese de peptídeos em fase sólida. Desse modo, as sequências dos inibidores cíclicos, correspondentes aos inibidores tradicionais, foram iniciadas com um resíduo de glicina para facilitar a posterior adição de cisteína (Chan & White, 2000), sem alterar a atividade dos peptídeos, como já verificado anteriormente por nosso grupo. Outro aminoácido adicionado sem o propósito de alterar a funcionalidade dos peptídeos foi um resíduo de tirosina (Y) inserido na extremidade N-terminal para facilitar a quantificação espectrofotométrica dos mesmos, como descrito no item 4.1.8. Para os peptídeos contendo o motivo dedo de zinco, esse resíduo de tirosina (Y) foi adicionado à extremidade C-terminal.

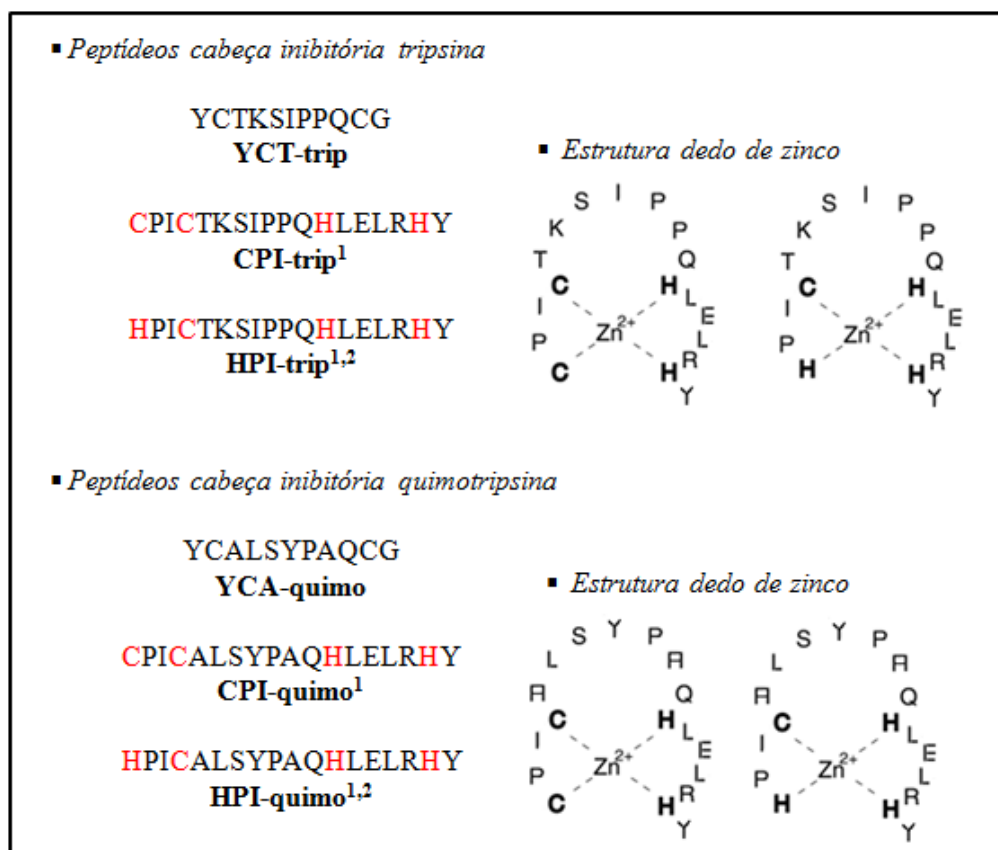


Figura 8: Estrutura primária dos inibidores peptídicos cíclicos e com motivos dedo de zinco sintetizados. ¹ Estruturas segundo Iuchi & Kuldell (2005); ² Sequencia de dedo de zinco contendo três histidinas no sítio de coordenação, como descrito por Negi e colaboradores (2004).

Assim, empregando-se a estratégia Fmoc/tBu, os peptídeos foram sintetizados manualmente em fase sólida pelo método proposto por Merrifield (1963).

5.2. Purificação e caracterização dos peptídeos cíclicos

Após a síntese em fase sólida, os peptídeos cíclicos correspondentes aos inibidores naturais foram submetidos à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC para a análise de pureza (Figura 9), apresentando um único pico. Estes peptídeos foram então analisados por espectrometria de massas, em espectrômetro de massas LCMS-IT-TOF com fonte de ionização do tipo *electrospray*. A figura 10 apresenta os espectros de massas dos inibidores peptídicos identificados, destacando-se os picos correspondentes ao peptídeo.

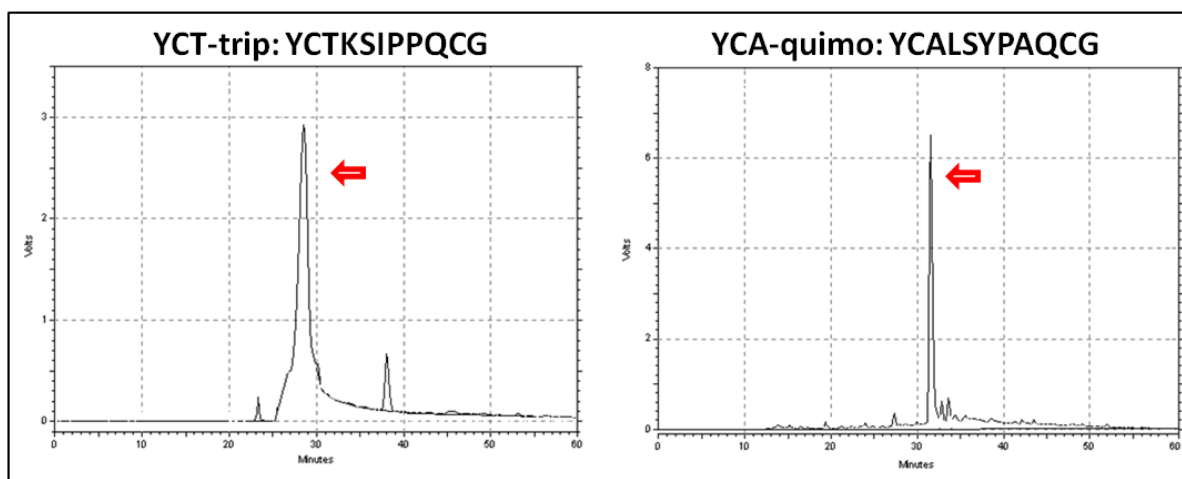


Figura 9: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos cíclicos sintetizados (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 10mm – Lichrocart 250-10 Purospher). Foi empregado gradiente de ACN variando de 25 a 60% em 65 minutos e TFA 0,1% durante 30 minutos sob um fluxo de 1 mL/min.

Os valores de massa molecular corrigidos, encontrados no modo electrospray positivo [ES m/z : $(M + H)^+$], estão apresentados na Tabela 2. Os resultados foram condizentes com o valor teórico esperado, predito pela ferramenta *Expasy – Compute PI/Mw tool*, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas e seu grau de pureza.

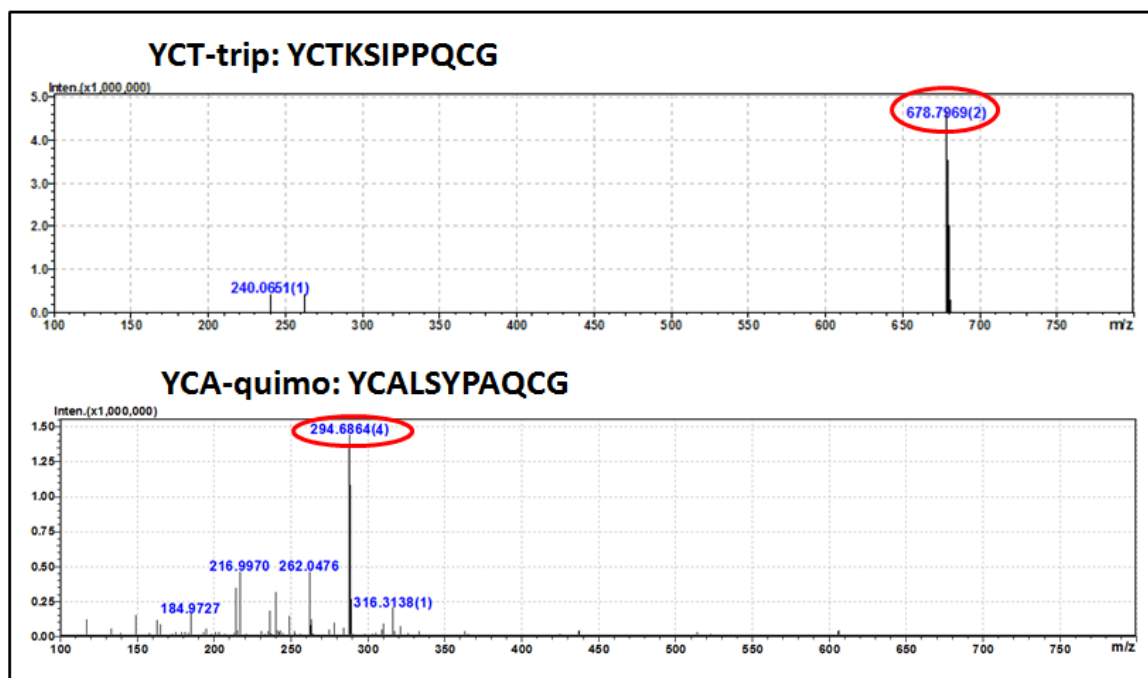
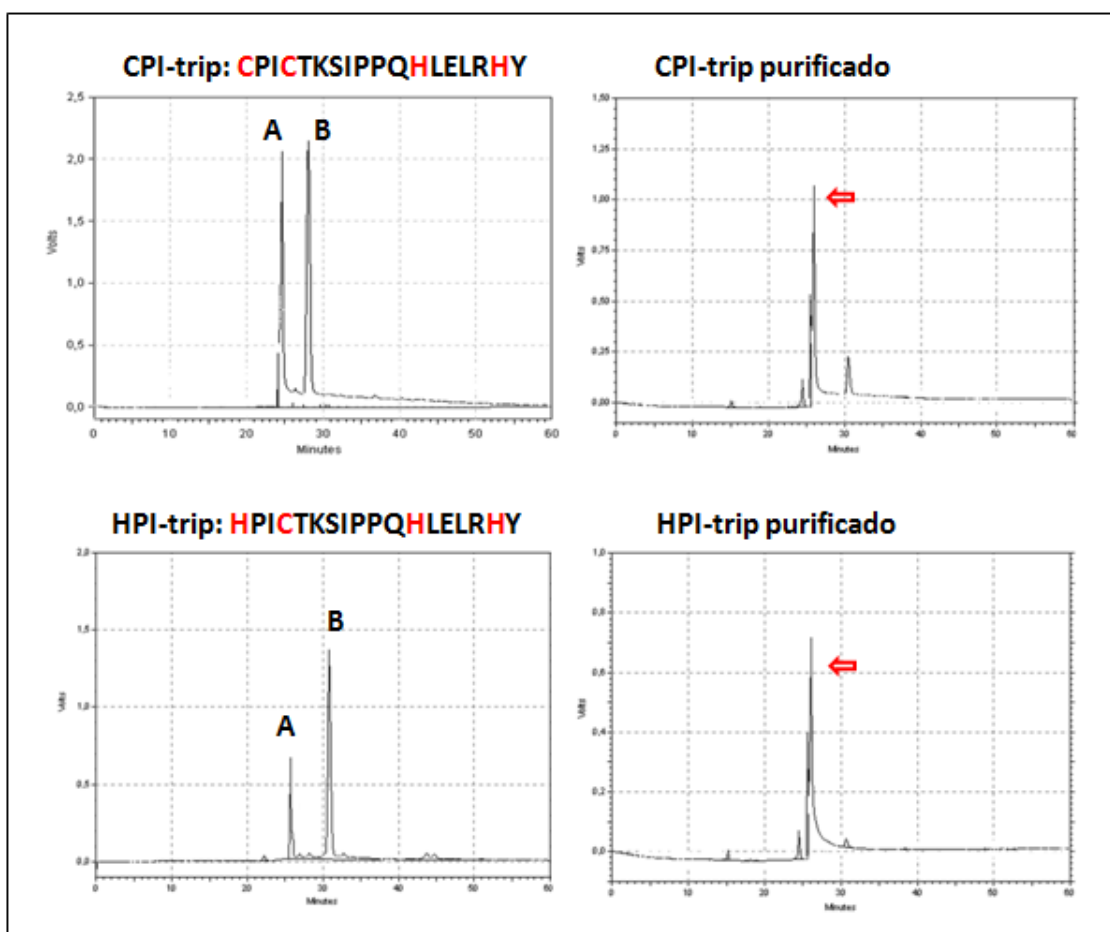


Figura 10: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo *electrospray* dos peptídeos inibidores cíclicos YCT-trip e YCA-quimo. Os picos destacados apresentam a relação massa/carga (m/z) referente ao peptídeo com a massa molecular esperada. Entre parênteses, é demonstrada a carga positiva adquirida durante a ionização.

5.3. Purificação e caracterização dos peptídeos contendo o motivo dedo de zinco

Para a análise dos peptídeos empregados na complexação com o íon Zn^{+2} foi utilizado o ditioneitol (DTT) para redução das ligações dissulfeto, com o objetivo de manter as cisteínas em estado livre. A oxidação das cisteínas poderia originar ligações dissulfeto entre peptídeos, gerando agregados polipeptídicos com diferentes tempos de retenção, dificultando sua purificação por cromatografia.

O excesso de DTT foi eliminado durante a purificação dos fragmentos sintetizados empregando cromatografia de exclusão molecular em coluna contendo resina Sephadex G15. As frações livres de DTT foram liofilizadas e novamente submetidas à cromatografia de fase reversa para confirmação do sucesso da purificação. Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos após a purificação estão representados na figura 11, juntamente com os respectivos cromatogramas obtidos antes da purificação. Houve predominância de um único componente principal (picos indicados pelas setas vermelhas) para todos os peptídeos sintetizados, demonstrando um grau satisfatório de pureza.



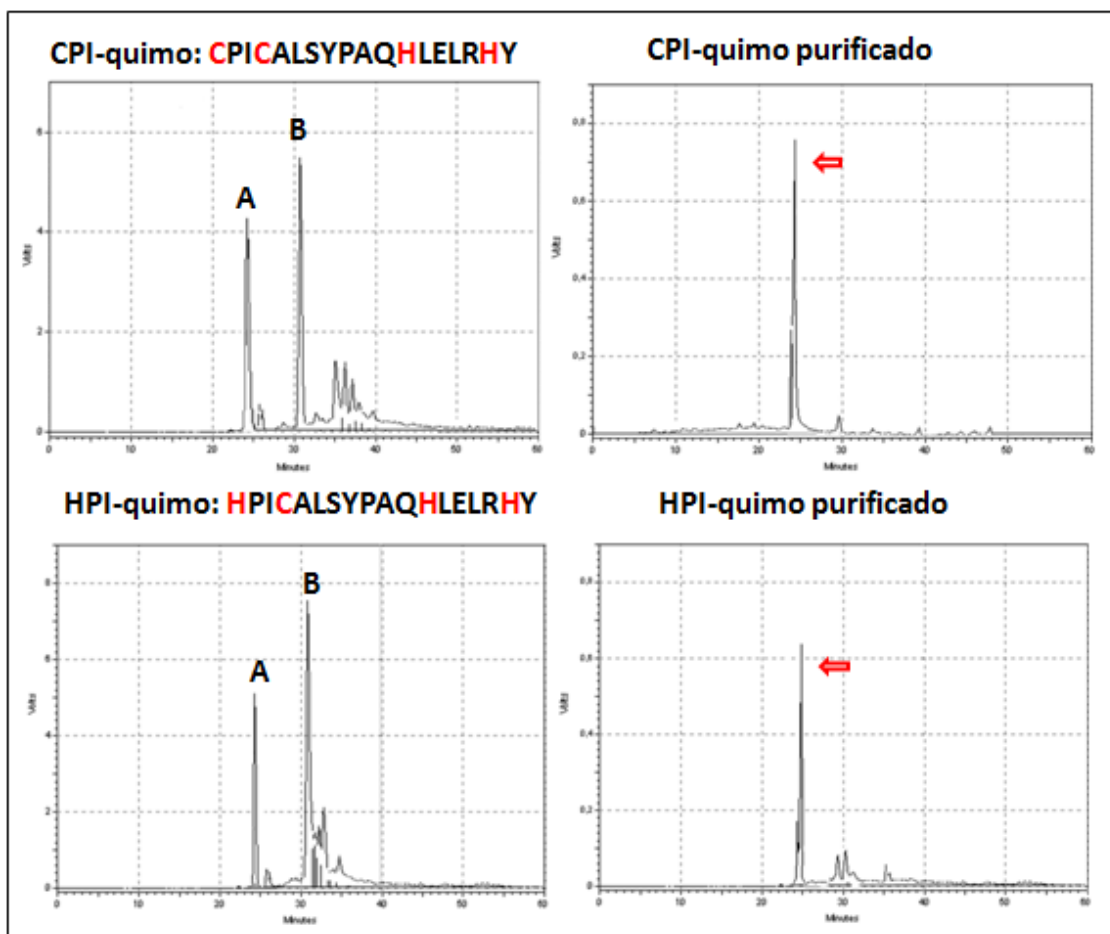


Figura 11: Perfis cromatográficos em sistema HPLC dos peptídeos contendo motivo dedo de zinco (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 10 mm - Lichrocart 250-10 Purospher). Foi empregado gradiente de ACN de 25 a 60% em 65 minutos e TFA 0,1% durante 30 minutos sob um fluxo de 1 mL/min. ‘A’ e ‘B’ referem-se aos picos observados correspondentes ao peptídeo e ao DTT, respectivamente.

Após o processo de purificação, os peptídeos também foram submetidos à identificação por espectrometria de massas. A figura 12 apresenta os espectros de massas dos peptídeos identificados, com os picos correspondentes ao peptídeo de massa molecular esperada destacados em vermelho. Na tabela 2 também se encontram os valores de massa molecular corrigidos, encontrados no modo electrospray positivo [ES m/z : $(M + H)^+$], e os resultados foram condizentes com o valor teórico esperado, confirmando a pureza do material obtido após a purificação.

Tabela 2: Valores de massa molecular encontrados por análise em LC-MS.

<i>Peptídeo</i>	<i>Massa molecular (g/mol) ^a</i>	<i>ES m/z (M+H)⁺ ^b</i>
YCT-trip	1.356,6	1.355,59
CPI-trip	2.134,53	2.134,81
HPI-trip	2.168,53	2.168,15
YCA-quimo	1.174,34	1.174,75
CPI-quimo	2.113,47	2.113,04
HPI-quimo	2.147,47	2.147,09

^a Valor teórico obtido através do software ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) e corrigido pela subtração de 1 Da no valor final da massa molecular, devido à utilização da Resina Rink Amide para a síntese, de forma que os peptídeos são obtidos com a extremidade C-terminal na forma amidada.

^b Valor encontrado por espectrometria de massas e corrigido pela subtração da carga positiva adquirida durante a ionização, de acordo com as figuras 10 e 12.

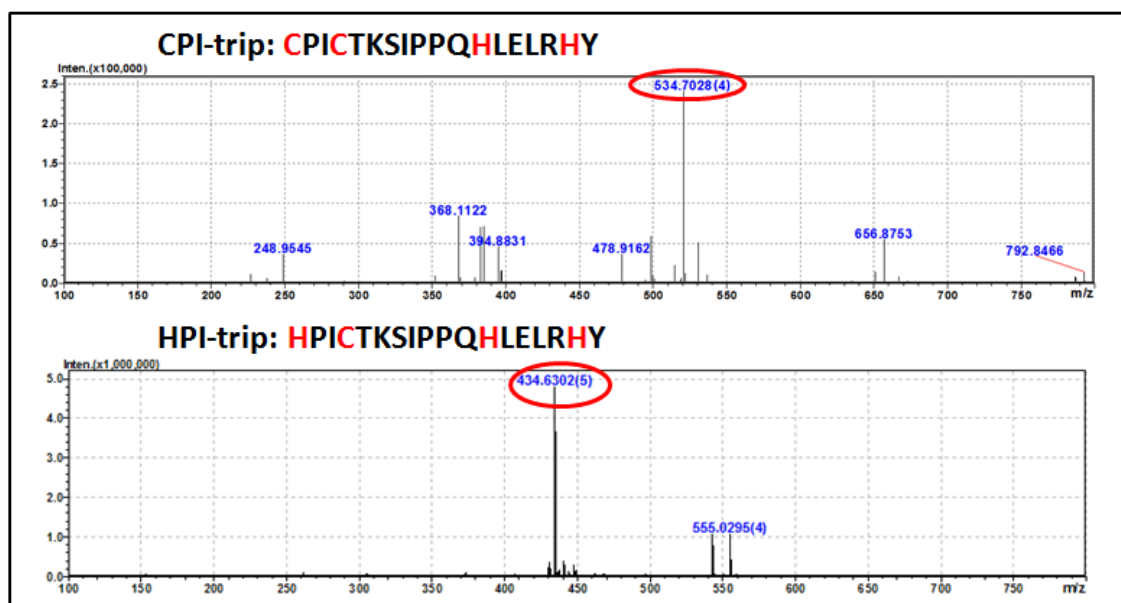


Figura 12: Espectros de massas obtidos por LCMS-IT-TOF do tipo *electrosray* dos peptídeos contendo motivo do tipo dedo de zinco. Os picos destacados apresentam a relação massa/carga (m/z) referente ao peptídeo com a massa molecular esperada. Entre parênteses, é demonstrada a carga positiva adquirida durante a ionização.

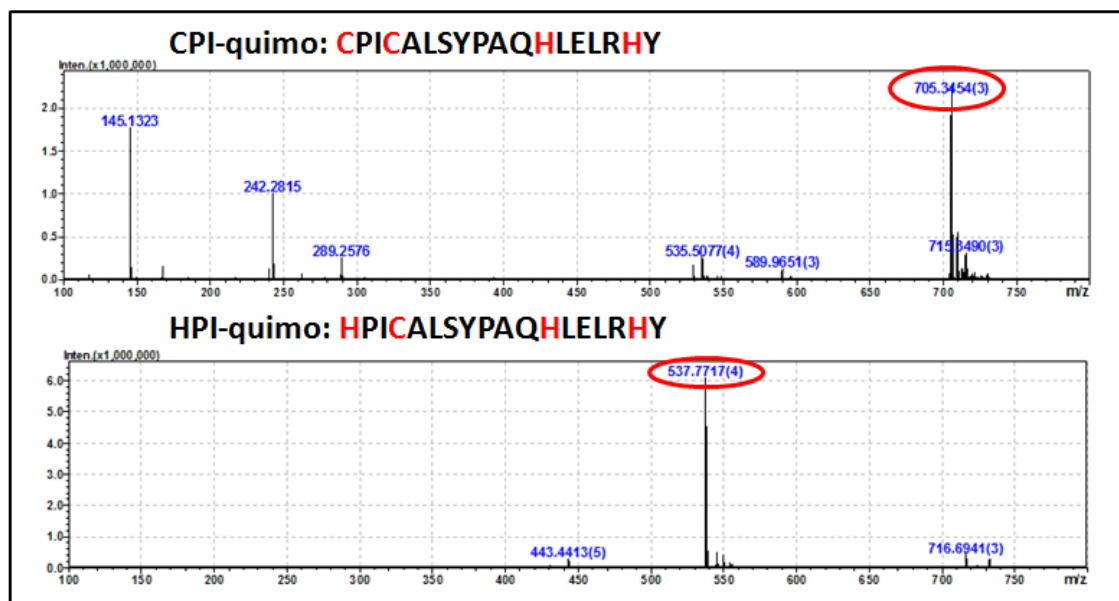


Figura 12: Continuação.

De maneira geral, os resultados mostrados acima sugerem que os procedimentos utilizados para a síntese, clivagem peptídeo-resina e purificação foram bem sucedidos, levando à obtenção das seqüências desejadas, confirmadas através dos dados de massa molecular e pureza dos produtos sintetizados.

5.4. Determinação de grupos sulfidril livre

Nos motivos dedo de zinco, para que ocorra a interação metal-proteína é essencial que os grupos tiol das cadeias laterais dos resíduos de cisteína estejam na sua forma reduzida, mesmo em motivos dedo de zinco artificiais, como é o caso do CH3 (Andreini, 2011, Negi *et al.*, 2004). Desse modo, para que os inibidores peptídicos sintéticos ofereçam condições adequadas para a ligação em questão, é importante quantificar o número de grupos sulfidril livres em cada uma das seqüências sintetizadas.

Assim, para quantificá-los, empregou-se o teste de Ellman's (Bulaj, *et al.*, 1998) que emprega o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), como reagente, seguindo o procedimento descrito no item 4.2. A análise de grupos SH livres foi feita para as quatro seqüências peptídicas contendo dedo de zinco, antes e após os ensaios de titulação com o íon cobalto e competição com zinco, e os valores obtidos são apresentados na tabela 3. Nota-se que, para os inibidores contendo duas cisteínas, a quantidade de sulfidril livre (em mM)

corresponde aproximadamente ao dobro da concentração dos peptídeos, enquanto que para os peptídeos contendo apenas uma cisteína essa razão aproximou-se de um. Esses dados mostram que os grupos tiol estão originalmente na forma reduzida, o que permite a utilização direta dos mesmos para a complexação com íons metálicos.

5.5. Titulação dos fragmentos peptídicos com íon cobalto

Sondas espectroscópicas desempenham um importante papel na caracterização estrutural de moléculas biológicas. Uma boa sonda deve combinar razoável sensibilidade com variabilidade das propriedades espectroscópicas, para que possa ser observada em baixas concentrações e para fornecer informações sobre propriedades estruturais e/ou dinâmicas do sítio de complexação das moléculas em estudo (Frankel *et al.*, 1987). A intensidade dos espectros de absorção oferece informações sobre os tipos de ligantes em torno do íon metálico e sua geometria. A absorção da luz é acompanhada pelo rearranjo dos elétrons nos orbitais do metal e dos ligantes envolvidos, o que reflete nos valores do coeficiente de extinção (Shi *et al.*, 1993).

Para a análise do sítio de ligação do íon zinco (II) em metaloproteínas, é comumente empregado como sonda o íon cobalto (II), pois complexos formados com esse metal têm espectros de absorção característicos – não apresentados pelo Zn^{2+} devido a diferenças em sua configuração eletrônica – e que permitem o acompanhamento das alterações por titulação do ligante com o cobalto (Gray, 1980). Dessa forma, mudanças nos espectros no UV-visível decorrentes da adição do íon Co^{2+} foram utilizadas para investigar a geometria do complexo peptídeo-metal e para determinar a melhor razão estequiométrica para a coordenação do Zn^{2+} com os inibidores sintetizados.

Como pode ser visto na figura 13, a adição sucessiva da solução de cloreto de cobalto alterou a absorção de ambos os peptídeos em faixas similares de comprimento de onda (indicadas pelas setas vermelhas). A banda de absorção na região de 250 a 300nm corresponde a transferência de cargas do grupo tiol do ligante para o metal $S \rightarrow Co(II)$, e ocorre para ambos os peptídeos, indicando que o motivo dedo de zinco CH3 também é capaz de interagir com íons metálicos. Vale ressaltar que a concentração do peptídeo HPI-trip no ensaio foi aproximadamente o dobro da concentração do peptídeo CPI-trip (que contém o dobro de grupos tiol), acarretando na similaridade entre a altura das bandas dessa região. Não

obstante a existência de interação do metal com ambos os peptídeos, a determinação dos grupos sulfidríla livres após a adição do metal mostra que a formação do complexo foi mais eficiente para o peptídeo CPI-trip do que para o peptídeo HPI-trip. Essa menor eficiência pode estar relacionada às diferenças de afinidade entre o íon e os peptídeos, as quais seriam devidas, provavelmente, aos diferentes resíduos de aminoácidos que compõem o motivo dedo de zinco. A diferença do perfil de varreduras entre os peptídeos corrobora com essa hipótese, pois indica tipos distintos de interações entre esses e o Co^{2+} .

A titulação pode fornecer ainda informações sobre a geometria de coordenação assumida pelo íon após a ligação metal-peptídeo. Essa geometria depende do número de elétrons presente na camada de valência 'd' do íon e desse modo, complexos com o Zn^{2+} e Co^{2+} apresentam, na maioria das vezes, geometria tetraédrica (Haas & Franz, 2009). Isso ocorre para os motivos dedo de zinco naturais descritos até o momento, nos quais há no mínimo dois grupos -SH presentes mantendo a quelatação com o íon (Andreini *et al.*, 2011).

No entanto, motivos do tipo CH3 e H4 nunca foram encontrados na natureza. Negi e colaboradores (2004) sugerem que a coordenação do íon Zn^{2+} com motivos CH3 sintéticos (como os peptídeos HPI-trip e HPI-quimo) apresenta geometria pentagonal, diferentemente dos motivos naturais C2H2 (como o peptídeo CPI-trip e CPI-quimo), C3H e C4. Tais afirmações são feitas com base na análise das bandas na região entre 600 e 700 nm, onde maiores intensidades indicam geometria tetraédrica, enquanto que a formação de complexos pentagonais gera bandas menores (Párraga *et al.*, 1990). Como mostrado na figura 13, esse comportamento pode ser observado para os peptídeos sintetizados em nosso estudo. O sítio de coordenação insaturado no zinco complexado ao peptídeo HPI-trip seria ocupado por uma molécula de água (Negi *et al.*, 2004).

A influência da sequência de aminoácidos na formação do complexo é também evidenciada pela quantidade de cobalto necessária à saturação (Figura 14). Enquanto que o aumento da absorbância a 350 nm durante a titulação do peptídeo contendo duas cisteínas ocorre até que sejam atingidas razões metal/peptídeo próximas a 1, para o peptídeo contendo apenas uma cisteína a saturação do complexo é obtida em razões metal/peptídeo próximas a 0,5. Segundo Chen e colaboradores (2000), a alteração da absorbância em comprimentos de onda próximos a região do UV pode ser atribuída à transferência de carga do grupo tiol para o Co^{2+} , justificando as diferenças nessa região do espectro para os dois peptídeos, visto o número diferente de resíduos de cisteína apresentado por cada um deles.

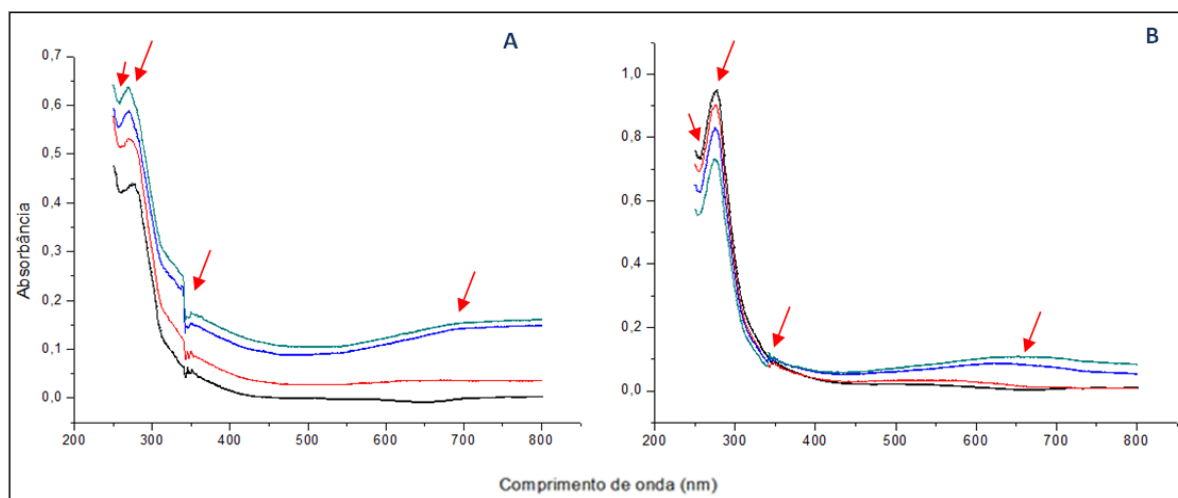


Figura 13: Espectros de absorção no UV-visível de Cobalto (II) coordenado com os peptídeos CPI-trip (A) com 0; 0,07; 0,22 e 0,66 eq de Co^{+2} e HPI-trip (B) com 0; 0,05; 0,20 e 0,65 eq de Co^{+2} .

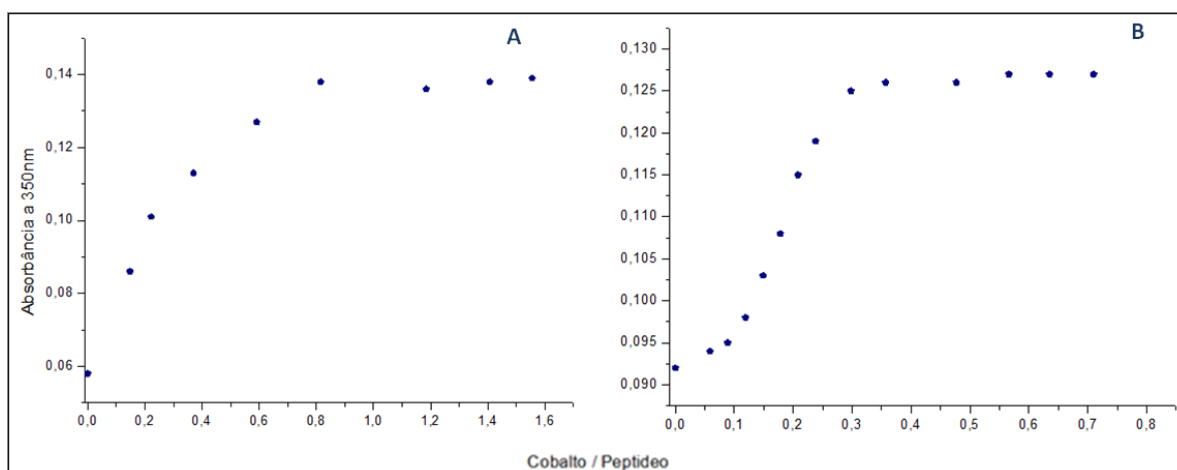


Figura 14: Dependência da banda de transferência de cargas $\text{S} \rightarrow \text{Co(II)}$ a 350 nm, de acordo com o aumento da quantidade de número de mols de Co^{+2} adicionado: A: peptídeo CPI-trip; B: peptídeo HPI-trip.

5.6. Ensaio de competição entre Cobalto e Zinco

A afinidade do Zn^{2+} com os peptídeos sintetizados foi determinada usando experimentos de competição com o cobalto, sendo adicionadas alíquotas de ZnCl_2 aos peptídeos recém titulados. Esses experimentos mostraram que o íon zinco (II) desloca facilmente o íon Cobalto (II) do complexo. Como pode ser observado na figura 15, a adição de Zn^{2+} altera o espectro de absorção dos peptídeos complexados com cobalto, diminuindo a

absorção de luz em todos os comprimentos de onda para o peptídeo CPI-trip e da região entre 250 e 300 nm para o peptídeo HPI-trip. Esses dados mostram que o Zn^{2+} liga-se ao mesmo sítio que o Co^{2+} e apresenta maior constante de dissociação para a formação do complexo, uma vez que a concentração da solução de $ZnCl_2$ necessária para o deslocamento do espectro é aproximadamente a mesma dos peptídeos, enquanto existe excesso de cobalto no meio.

Como forma de avaliar a formação do complexo entre o Zn^{2+} e os peptídeos, foi realizada a determinação dos grupos sulfidrila livres antes e após os ensaios de complexação. A tabela 3 mostra os valores encontrados para as duas situações, e a diminuição no número de grupos $-SH$ livres indica o sucesso da formação do complexo zinco-peptídeo. Interessantemente, o rendimento da ligação foi maior para os peptídeos contendo dois resíduos de cisteína (86 e 89%, para CPI-trip e CPI-quimo, respectivamente) do que para aqueles contendo apenas um resíduo que correspondem aos dedos de zinco modificados (72 e 24%, para HPI-trip e HPI-quimo, respectivamente). Já foi demonstrado que a substituição dos resíduos ligantes de motivos dedo de zinco pode aumentar a reatividade do sítio de ligação com uma molécula de água, reduzindo sua complexação com metais. (Negi *et al.*, 2004; Nomura & Sugiura, 2004). Este fato poderia explicar a menor eficiência para a formação do complexo, como notado para o HPI-quimo citado anteriormente.

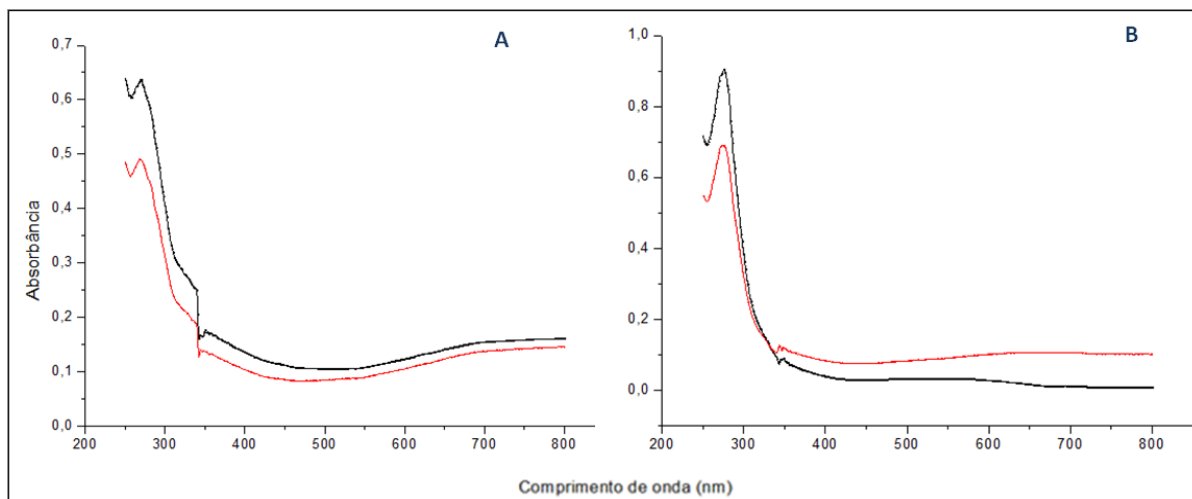


Figura 15: Deslocamento dos espectros de absorção dos peptídeos CPI-trip na concentração de 63 μM (A) e HPI-trip a 133 μM (B) complexados com Co^{2+} após adição de Zn^{2+} . Linha preta: Espectro com $CoCl_2$. Linha vermelha: Espectro após adição de $ZnCl_2$.

Os ensaios não foram realizados para os peptídeos correspondentes à cabeça inibitória de quimotripsina, pelo motivo de que a sequência do sítio de coordenação é a mesma presente nos peptídeos inibidores de tripsina.

Tabela 3: Análise da formação de complexo pela titulação de grupos sulfidríla.

Peptídeo	Concentração (mM)*	Previamente à	Após adição	Porcentagem de Complexação
		adição de zinco**	de zinco**	
		<i>SH livres</i> (mM)	<i>SH residual</i> (mM)	
<i>CPI-trip</i>	4,54	8,81	1,23	86%
<i>HPI-trip</i>	3,15	3,07	0,85	72%
<i>CPI-quimo</i>	5,07	9,22	1,04	89%
<i>HPI-quimo</i>	1,17	1,10	0,84	24%

*Concentração de peptídeo estimada pela absorvidade a 280nm.

** Concentração de grupos SH titulados com DTNB.

5.7. Ensaio Enzimáticos

Inibidores da família Bowman-Birk possuem uma estrutura simétrica com dois domínios encerrados por uma ligação dissulfeto, cada um contendo um sítio de ligação independente para as enzimas tripsina e quimotripsina (Clemente *et al.*, 2011). O *loop* de ligação está contido dentro de uma região nonapeptídica. Visto que esse *loop* isolado é fundamentalmente a porção inibitória da molécula íntegra, mas que por outro lado, apresenta estabilidade limitada, sua união com sequências estabilizadoras foi proposta para aumentar seu potencial de aplicação em situações que necessitem da regulação de proteases. Sabe-se que diferentes classes de proteínas dedo de zinco variam na natureza dos resíduos que interagem com o íon, mas todas têm em comum o fato de se ligar ao zinco de maneira estrutural ao invés de usá-lo em processos catalíticos (Matthews & Sunde, 2002).

5.7.1. Atividade inibitória anti-tripsina e anti-quimotripsina bovina

Com vista no descrito acima, os inibidores sintéticos contendo o motivo dedo de zinco foram ensaiados quanto suas atividades inibitórias e comparados ao BBI, aqui denominado BBI enriquecido (BBI-E), e aos peptídeos cíclicos análogos ao BBI. A pentamidina, um inibidor peptidomimético da atividade proteolítica tripsina-símile (Pućkowska *et al.*, 2008), também foi inserido em alguns dos ensaios. A tabela 4 mostra as concentrações de cada um dos inibidores necessárias para a inibição de 50% da atividade enzimática. Destacam-se sobre a atividade da tripsina o BBI, a pentamidina e o peptídeo YCT-trip.

Tabela 4: IC 50 dos inibidores utilizados.

Composto	Tripsina	Quimotripsina
BBI	$2,4 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-7}$
Pentamidina	$3,9 \times 10^{-6}$	Não inibe
YCT-trip	$1,15 \times 10^{-6}$	-
CPI-trip	$1,29 \times 10^{-4}$	-
HPI-trip	$5,22 \times 10^{-4}$	-
YCA-quimo	-	$1,9 \times 10^{-6}$
CPI-quimo	-	$1,03 \times 10^{-3}$
HPI-quimo	-	$4,51 \times 10^{-3}$

Quanto aos peptídeos contendo o motivo dedo de zinco, esses foram ensaiados previamente e após a complexação com o íon. Os resultados obtidos comprovam a importância do zinco na estruturação dos inibidores, visto a perda de grande parte de sua atividade inibitória sem a coordenação com o metal, uma vez que nenhum dos peptídeos lineares (sem zinco) alcançou a atividade inibitória de 50%, mesmo nas maiores concentrações testadas. Por outro lado, quando complexados com o íon Zn^{2+} todos os peptídeos exibiram atividade inibitória de 50% da enzima, nas concentrações mostradas na tabela 4. Como visto, são necessárias concentrações mais elevadas dos peptídeos contendo dedo de zinco para inibir 50% da atividade das enzimas, em relação aos demais inibidores.

Para a comparação das atividades inibitórias, os resultados obtidos nos ensaios foram normalizados pelas concentrações iniciais dos inibidores e são mostrados na figura 16.

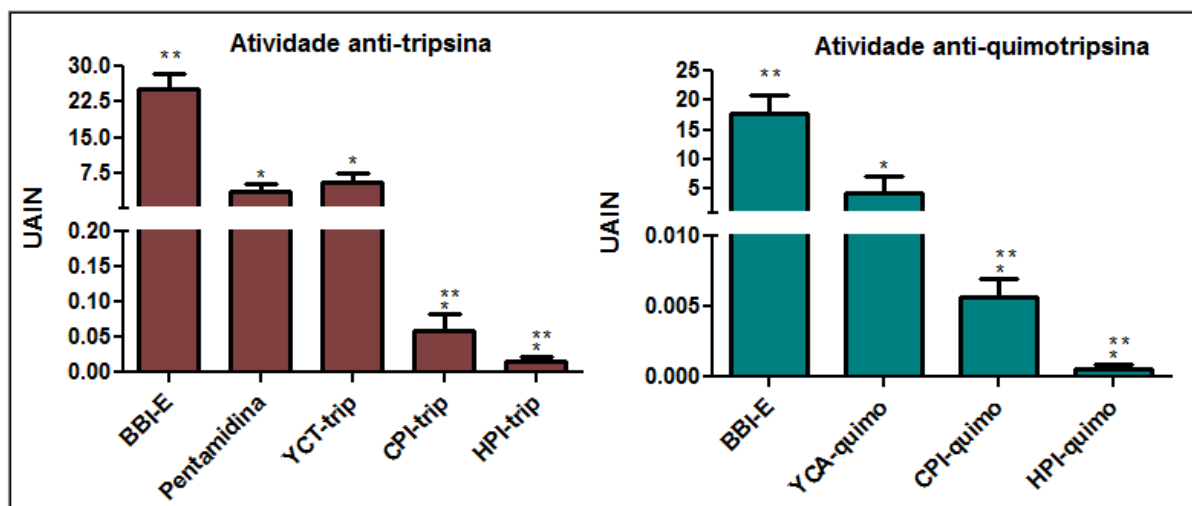


Figura 16: Ensaios de atividade enzimática na presença de inibidores de proteases. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA *one-way* seguido de pós-teste *Tuckey*. Adotou-se o nível de significância $p \leq 0,05$. $n = 5$.

* atividade inibitória significativamente diferente em relação ao BBI de cada grupo.

** atividade inibitória significativamente diferente em relação ao peptídeo cíclico de cada grupo.

Quanto à atividade antitripsina, a análise demonstra que o inibidor natural é cerca de quatro vezes mais ativo do que a cabeça sintética (YCT-trip), e esse ligeiramente mais potente do que a pentamidina. Em relação à atividade anti-quimotripsina o peptídeo sintético YCA-quimo também apresentou-se menos potente que o inibidor natural (diferença de aproximadamente quatro vezes). Por outro lado, as atividades inibitórias de todos os peptídeos contendo o motivo estrutural dedo de zinco foram muito inferiores aos demais. No entanto, a atividade dos peptídeos HPI-trip e HPI-quimo não apresentou diferença estatística dos peptídeos contendo duas cisteínas, a despeito do menor rendimento durante a formação de complexo com zinco para esses peptídeos. Esses resultados demonstram que a alteração da conformação da região inibitória desses peptídeos pela introdução do dedo de zinco prejudicou severamente a interação com as respectivas enzimas.

A exemplo do BBI, todos os outros inibidores exerceram maior atividade sobre a protease tripsina do que sobre a quimotripsina. Apesar das diferenças estatísticas encontradas, as cabeças inibitórias isoladas (YCT-trip e YCA-quimo) conservam parte da atividade inibitória do BBI nativo, em concordância com o que é encontrado na literatura (Gariani *et al.*, 1999). A despeito da menor atividade dos peptídeos cíclicos, essa talvez possa ser tomada como uma medida mais aproximada da atividade real do BBI, uma vez que a síntese das alças

inibitórias elimina a possibilidade da participação de contaminantes, como ocorre no caso do extrato de soja enriquecido (Hernandez & Ledesma, 2009).

Como esperado, a pentamidina possui apenas atividade inibitória sobre a tripsina na faixa de concentração próxima a um micromolar (Andrade & Mare-Guia, 1990), e por outro lado, não inibiu a quimotripsina (Pućkowska *et al.*, 2008).

5.7.2. Resistência à hidrólise enzimática

Frankel e colaboradores (1987) verificaram que a complexação do íon Zn^{2+} ao motivo dedo de zinco protegeu peptídeos da digestão trípica. Os autores presumiram que o dobramento conferido ao peptídeo na presença do zinco o torna menos susceptível à clivagem proteolítica.

Nos ensaios de recuperação da atividade enzimática após incubação com tripsina, o peptídeo CPI-trip apresentou comportamento similar aos peptídeos YCT-trip e HPI-trip (Figura 17). Esse dado não corrobora com a habilidade do motivo dedo de zinco de estabilizar o restante da molécula. Além disso, apesar da menor inibição (maior atividade enzimática residual) apresentada pelos peptídeos CPI-trip e YCT-trip ao início do ensaio, nota-se pela inclinação das retas, que a perda da capacidade inibitória é mais pronunciada para o BBI do que para os três peptídeos, de modo que, ao final dos 180 minutos de incubação a atividade trípica é extremamente semelhante para os três inibidores (aproximadamente 87%).

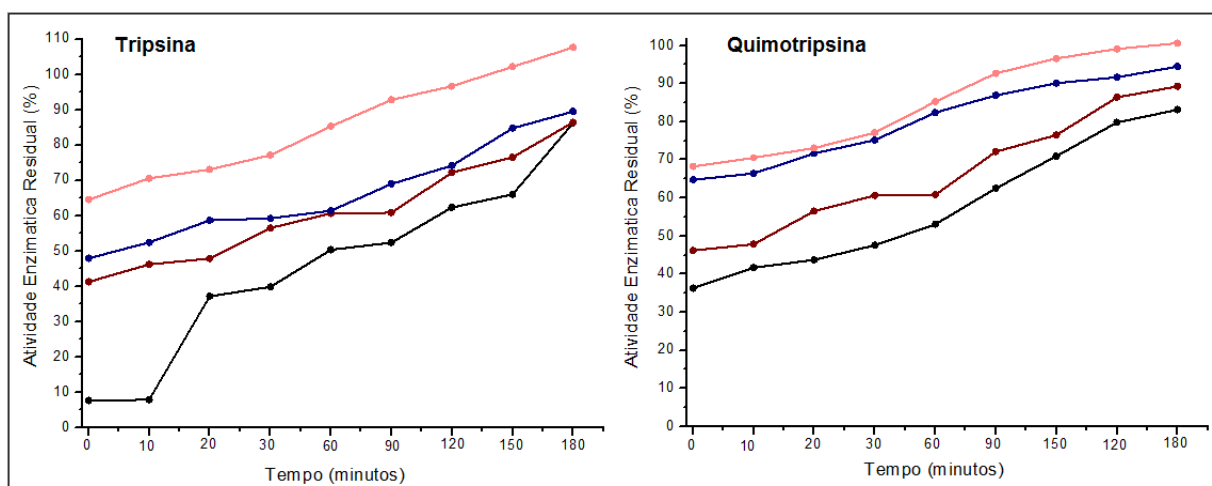


Figura 17: Taxa de hidrólise pelas enzimas tripsina e quimotripsina, empregando os inibidores BBI (preto); YCT-trip (vinho); CPI-trip (azul); HPI-trip (rosa); YCA-quimo (vinho); CPI-quimo (azul); HPI-quimo (rosa). Atividade residual da enzima expressa em porcentagem.

Para os ensaios de inibição de quimotripsina, também não existe grande diferença entre os peptídeos contendo o motivo dedo de zinco e o peptídeo cíclico. Embora a susceptibilidade do inibidor natural tenha se apresentado ligeiramente maior, não houve nenhum benefício da introdução de dedo de zinco, uma vez que a clinação dos gráficos são semelhantes observando-se a mesma recuperação da atividade enzimática ao longo do tempo.

5.7.3. Determinação da estabilidade térmica dos inibidores

Em virtude de características como tamanho reduzido, presença de pontes dissulfeto, ligações de hidrogênio e resíduos de prolina presentes na alça de inibição, os inibidores do tipo Bowman-Birk possuem uma rigidez estrutural que garante sua atividade inibitória até mesmo em condições desfavoráveis, como temperaturas elevadas, força iônica e extremos de pH, principalmente em condições ácidas (Osman *et al.*, 2002).

Testes de termoestabilidade foram realizados para o BBI e peptídeos CPI-trip, HPI-trip, CPI-quimo e HPI-quimo, nos quais a região formadora da ligação dissulfeto foi substituída pelo motivo dedo de zinco (Figura 18).

Para o teste realizado com quimotripsina, nota-se que a inclinação da curva de todos os peptídeos é menos acentuada quando comparada à do BBI, o que não aconteceu no ensaio empregando a tripsina, onde o BBI mostrou-se mais resistente a variações de temperatura.

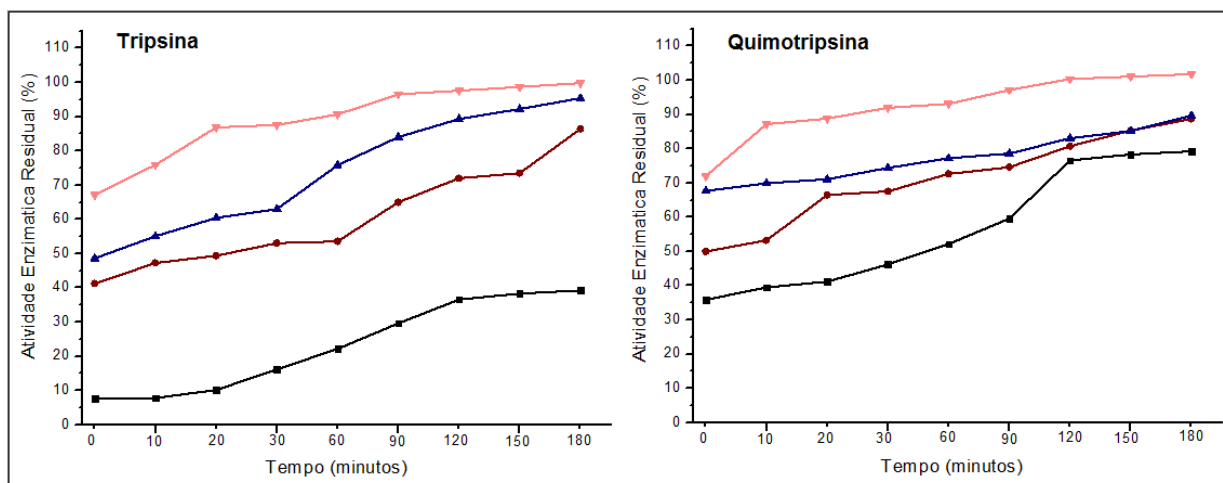


Figura 18: Estabilidade térmica dos inibidores frente às enzimas tripsina e quimotripsina. BBI (preto); YCT-trip (vinho); CPI-trip (azul); HPI-trip (rosa). BBI (preto); YCA-quimo (vinho); CPI-quimo (azul); HPI-quimo (rosa). Atividade residual da enzima expressa em porcentagem.

Para a enzima tripsina o peptídeo HPI-trip mostrou-se mais resistente do que os peptídeos YCT-trip e CPI-trip. Interessantemente, o CPI-trip mostrou-se mais susceptível à variações térmicas do que o cíclico. No entanto, para a quimotripsina, os peptídeos contendo dedo de zinco foram mais resistentes do que o peptídeo cíclico, sendo que o CPI-quimo foi o mais resistente. Esses resultados estão de acordo com a estabilidade térmica de peptídeos contendo dedo de zinco encontrada por Frankel e colaboradores (1987). Os autores demonstram que os espectros de dicroísmo celular das moléculas analisadas apresentam pequenas alterações – de caráter reversível – na faixa de temperatura de 4°C a 75°C.

5.7.4. Determinação da resistência dos inibidores ao ambiente redutor

O ambiente redutor proporcionado pelo DTT foi a condição testada que exerceu os efeitos mais acentuados sobre os inibidores (Figura 19).

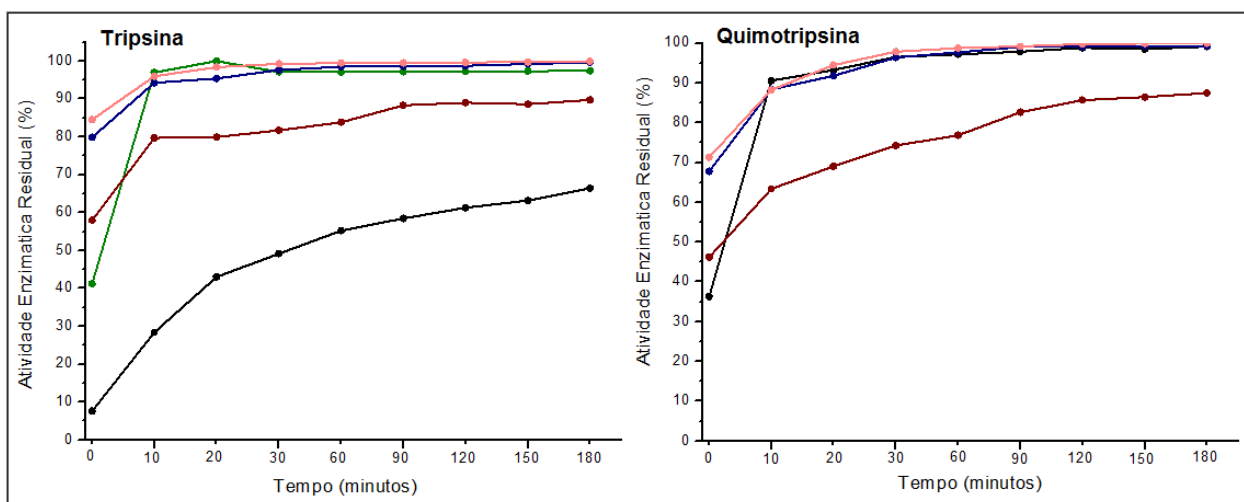


Figura 19: Resistência dos inibidores ao ambiente redutor. BBI (preto); Pentamidina (verde); YCT-trip (vinho); CPI-trip (azul); HPI-trip (rosa); BBI (preto); YCA-quimo (vinho); CPI-quimo (azul); HPI-quimo (rosa). Atividade residual da enzima expressa em porcentagem.

Analisando a atividade anti-tripsina, observa-se que a presença do agente redutor afeta mais a atividade inibitória do BBI do que a dos análogos sintéticos, embora não sejam notadas diferenças substanciais de resistência dos análogos sintéticos. Do ponto de vista da atividade anti-quimotripsina, essa condição parece ter um efeito deletério maior sobre a atividade

inibitória do BBI, observando-se uma menor atividade do inibidor natural em relação aos análogos contendo dedo de zinco e à cabeça de inibição sintética. Embora tenha apresentado maior inibição no início do ensaio, a perda de inibição é praticamente instantânea para essa região do inibidor, sendo que logo no tempo de 10 minutos a atividade enzimática atinge aproximadamente 100%.

Os peptídeos contendo o motivo dedo de zinco (tanto inibidores de tripsina quanto de quimotripsina) mostraram menor resistência ao ambiente redutor, permitindo supor que a coordenação com o íon zinco não favoreça a permanência desses em ambiente redutor.

Considerando as análises de resistência à hidrólise, resistência térmica e resistência à presença de agente redutor, concluímos que a introdução do dedo de zinco não trouxe vantagens aos inibidores sintéticos.

5.8. Ensaios de inibição do proteassoma 20S

Considerando que o efeito quimiopreventivo do BBI é também associado com o controle da apoptose e divisão celular, via inibição do proteassoma, e que as subunidades catalíticas desse complexo possuem atividade do tipo caspase-símile, tripsina-símile e quimotripsina-símile (Kisselev *et al.*, 2006), foi avaliada a atividade dos inibidores peptídicos sintetizados, bem como da molécula do BBI e do inibidor de protease pentamidina sobre esse complexo proteolítico 20S.

Desse modo, extratos de proteínas da fração solúvel de fígado de Ratos Wistar pré-enriquecidos em proteassoma 20S foram obtidos como descrito no item 4.6., e submetidos à cromatografia de filtração molecular em resina Fractogel® EMD BioSEC (S). Como pode ser observado na figura 20, o intervalo correspondente às frações 19 a 32 apresentou maior nível de proteínas, detectadas pela medida da absorbância a 280 nm. Essas frações foram analisadas quanto à atividade peptidásica quimotripsina-símile utilizando o substrato Suc-LLVY-MCA na presença e na ausência do inibidor MG-132 a 200 µM. O ensaio de atividade peptidásica quimotripsina-símile nessas condições permite enriquecer ainda mais o extrato total de proteínas solúveis com a fração de interesse (Kimura *et al.*, 2000).

Como pode ser observado no perfil cromatográfico (Figura 20) a atividade proteolítica se estendeu da fração 20 a fração 36 e apresentou-se defasada da atividade na presença do inibidor específico para o proteassoma (MG132). Apenas as frações situadas entre os tubos 22 a 28, foram recolhidas para se obter uma preparação enriquecida em proteassoma, pelo fato de corresponderem às frações de maior massa molecular totalmente inibidas pelo inibidor específico.

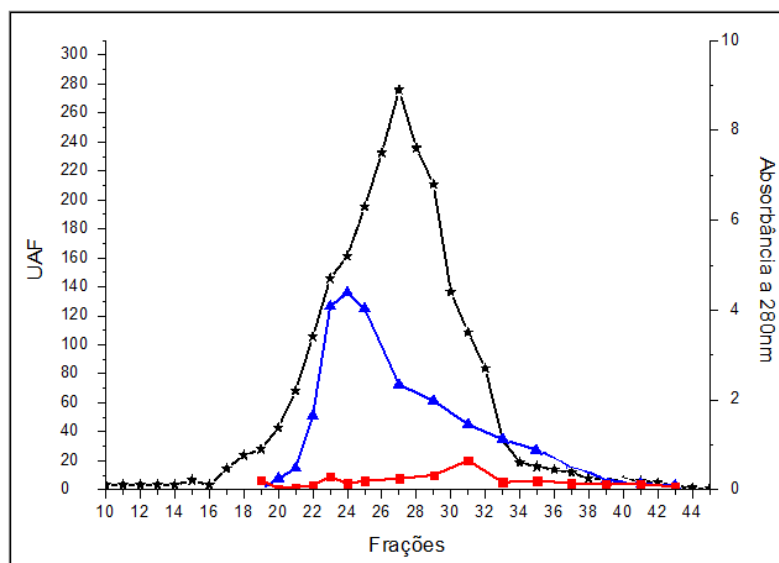


Figura 20: Cromatograma a 280 nm e medidas da atividade peptidásica quimotripsina-símile dos extratos proteicos de fígado de Ratos Wistar na ausência e presença de MG-132 a 200 μ M. Substrato: Suc-LLVY-MCA. UAF: Unidades Arbitrárias de Fluorescência.

As frações recolhidas foram submetidas à SDS-PAGE para análise dos perfis proteicos das preparações, como mostrado na figura 21. A seta indica a região compreendida entre as bandas proteicas presentes na região entre 20 e 30 kDa, correspondentes às massas moleculares de subunidades α do proteassoma 20S, demonstrando um enriquecimento da preparação em relação ao extrato total. A permanência dessas e a diminuição da intensidade de outras bandas, quando comparadas as canaletas referentes ao extrato total e à fração enriquecida, confirmam o enriquecimento da amostra.

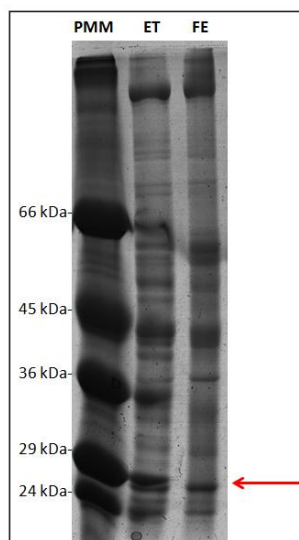


Figura 21: SDS-PAGE 10% das frações proteicas do extrato total e enriquecidas com proteassoma 20S identificadas pela medida da atividade quimotripsina-símile. PMM: Padrão de Massa Molecular; ET: Extrato Total; FE: fração enriquecida. Quantidades equivalentes de proteínas (10 μ g) do extrato total (ET) e da fração enriquecida (FE) foram utilizadas.

5.8.1. Atividade inibitória sobre o proteassoma 20S

A inibição do sítio quimotripsina-símile do proteassoma pode causar redução da proteólise celular diminuindo a sobrevivência de células cancerosas através da inibição do crescimento tumoral e da indução de apoptose em diversos modelos experimentais (Kisselev *et al.*, 2006). Chen e colaboradores (2005) observaram o acúmulo de substratos poli-ubiquitinados em células de câncer de mama após a exposição ao BBI, com consequente diminuição da expressão de ciclinas regulatórias do ciclo celular. Desse modo, visto a importância do BBI como inibidor da atividade quimotripsina-símile proteassomal, nós avaliamos o potencial inibitório dos peptídeos sintéticos análogos ao BBI-E e contendo o motivo dedo de zinco.

5.8.1.1. Avaliação da atividade quimotripsina-símile

Os potenciais inibitórios dos peptídeos sintetizados, do BBI-E e da pentamidina, foram avaliados pela medida da atividade peptidásica na faixa de concentração de 0,1 a 1000 μ M dos inibidores. A figura 27 (apêndice) mostra que todos os inibidores testados exerceram

atividade inibitória sobre o proteassoma. Os resultados encontrados para as concentrações de 0,1 e 100 μM são mostrados na figura 22.

De forma excepcional, a pentamidina exerceu forte atividade inibitória até mesmo na mais baixa concentração testada. A estrutura da pentamidina, a qual é composta por duas benzamidas – análoga à arginina –, não favorece sua interação com sítios catalíticos quimotripsina-símile, como mostrado no item 5.7.1.

Por outro lado, Nguewa e colaboradores (2005) demonstraram que a pentamidina, devido sua carga positiva em pH fisiológico, pode alterar a conformação da região básica da ubiquitina, responsável pelo endereçamento de proteínas danificadas ao proteassoma, e sugerem que, desse modo, o fármaco possa inibir as funções bioquímicas dessa proteína. Esses resultados, junto à inibição da função quimotripsina-símile do proteassoma encontrada em nosso trabalho, mostram que a pentamidina pode inibir o complexo proteolítico tanto na etapa de reconhecimento dos substratos ubiquitinados quanto na proteólise em si, empregando-se substratos sintéticos. No nosso caso, a possível explicação para a inibição proteassomal seria baseada também nas cargas positivas da pentamidina, as quais propiciariam sua interação com as regiões carregadas negativamente presentes na entrada do complexo proteassoma, facilitando seu acesso à região catalítica.

Entre os demais inibidores, o BBI e o YCA-quimo inibiram a atividade quimotripsina-símile mesmo nas concentrações mais baixas testadas (0,1 e 1 μM) enquanto que os inibidores CPI-quimo e HPI-quimo apresentaram atividade somente a partir de 10 μM . Do ponto de vista do efeito máximo, entre os peptídeos contendo dedo de zinco, o peptídeo CPI-quimo foi o que mostrou valores de atividade mais próximos à atividade do BBI.

Tanto em relação ao efeito máximo quanto para as concentrações de 0,1 μM , o peptídeo YCA-quimo exibiu atividade similar ao BBI, de modo contrário ao que ocorreu para os ensaios com a enzima quimotripsina bovina (item 5.7.1.). Esse resultado pode ser sustentado pelo fato de não haver necessariamente uma equivalência estrutural entre o sítio da quimotripsina bovina e do proteassoma. A inibição do proteassoma é do tipo não-competitiva, uma vez que o BBI não alcançaria o interior do complexo proteolítico, e o peptídeo YCA-quimo com estrutura idêntica ao domínio inibitório do BBI deve se ligar no mesmo sítio do proteassoma.

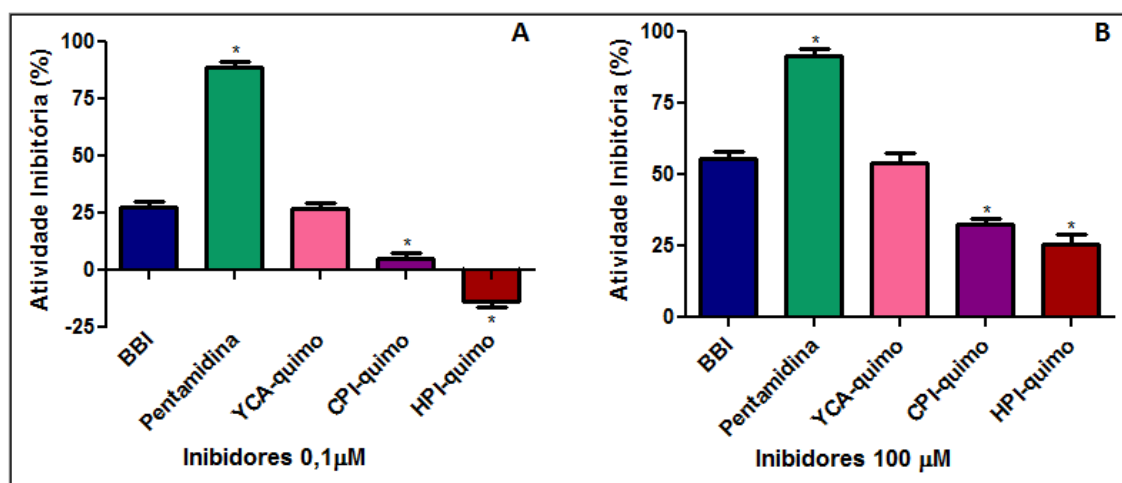


Figura 22: Avaliação da atividade quimotripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar na presença dos inibidores BBI, Pentamidina e peptídeos YCA-quimo, CPI-quimo e HPI-quimo. A: Concentração de 0,1 µM de inibidores; B: Concentração de 100 µM de inibidores. (Tais concentrações foram escolhidas com relação à curva mostrada na seção Apêndice). *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao BBI ($p \leq 0,05$). $n = 5$. Substrato: Suc-LLVY-MCA.

5.8.1.2. Avaliação da atividade tripsina-símile

Apesar das atividades anti-tumorais não terem sido observadas em moléculas de BBI modificadas com atividade inibitória apenas para tripsina, a atividade tripsina-símile envolvida na carcinogênese deve ser considerada alvo potencial de inibidores do tipo BBI e seus derivados (Clementea & Domoney, 2006). Desse modo, embora seja considerada menos importante para a proteólise celular, a inibição da atividade tripsina-símile do proteassoma também foi avaliada.

Os resultados dos ensaios de inibição da atividade tripsina-símile do proteassoma pelos inibidores testados são mostrados na figura 28 (apêndice). Neste ensaio, os inibidores YCT-trip, CPI-trip e HPI-trip foram capazes de inibir a ação do proteassoma apenas à partir da concentração de 10 µM. Como discutido anteriormente a estrutura da pentamidina possibilita sua interação com sítios catalíticos tripsina-símile. De maneira geral, a inibição da atividade tripsina-símile do proteassoma pelos inibidores foi ligeiramente menor quando comparada à inibição da atividade quimotripsina-símile (Abramova *et al.*, 2004).

Contrariamente ao que foi encontrado no ensaio para a atividade quimotripsina-símile, o aumento gradativo da concentração de BBI foi acompanhado pela diminuição de sua atividade inibitória, sugerindo que esse efeito pode ser decorrente da complexidade modulatória do proteassoma.

A figura 23 mostra os resultados para as concentrações 0,1 e 100 μM . Ao contrário do observado para os inibidores CPI-quimo e HPI-quimo no ensaio da atividade quimotripsina-símile, os inibidores CPI-trip e HPI-trip apresentaram atividade inibitória similar, sem diferenças estatísticas entre si para todas as concentrações testadas, mostrando que nesse caso, os peptídeos com dedo de zinco com duas ou uma cisteína exercem a mesma atividade sobre o proteassoma.

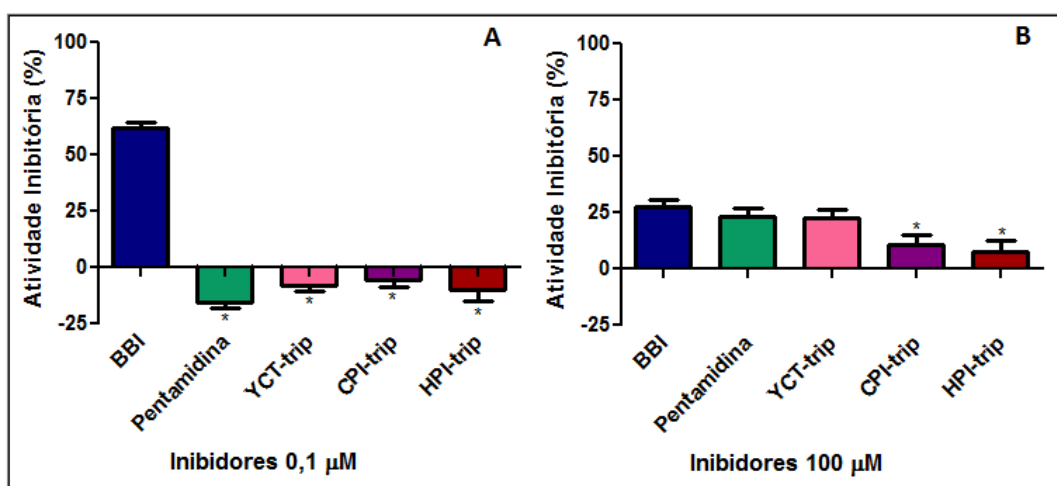


Figura 23: Atividade inibitória dos inibidores BBI, Pentamidina e peptídeos YCT-trip, CPI-trip e HPI-trip sobre a atividade tripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar. A: Concentração de 0,1 μM de inibidores; B: Concentração de 100 μM de inibidores. (Tais concentrações foram escolhidas com relação à curva mostrada na seção Apêndice). *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao BBI ($p \leq 0,05$). $n = 5$. Substrato: Boc-VPR-MCA.

Embora os derivados com dedo de zinco tenham apresentado atividade mais baixa em relação aos demais inibidores, um efeito inibitório substancial foi notado nas concentrações de 100 μM . A diminuição da afinidade pela modificação estrutural foi observada, mas a atividade inibitória foi preservada. Portanto, essa alteração da estrutura não foi vantajosa do ponto de vista da inibição do proteassoma.

5.9. Ensaio angiogênico em membrana corioalantóica de *Gallus gallus domesticus*

Embora ainda não sejam completamente conhecidos os mecanismos pelos quais o BBI exerce suas funções anti-carcinogênicas, sua habilidade intrínseca como inibidor de serino-proteases é fundamental, visto que o BBI quimicamente inativado não tem efeito significativo na proliferação de células cancerígenas (Clemente *et al.*, 2010).

Através da inibição de serino-proteases, o BBI impede a ativação de proteases envolvidas na degradação da membrana basal e matriz extracelular, como é o caso da serino-protease de membrana MT-SP1 (Yamasaki *et al.*, 2003). As metalo-proteases de matriz (MMPs), que são secretadas sob a forma de zimogênio, também necessitam da ação de serino-proteases para assumirem as formas ativas. Essa classe de enzimas participa da destruição da matriz extracelular em condições patológicas tais como artrite, doenças cardiovasculares e inflamação (Deguchi *et al.*, 2006). Em alguns tipos de tumores, as proteínas MMP-2 e MMP-9 têm sua expressão aumentada em comparação com tecidos normais e sua ativação é dependente de tripsina (Duncan *et al.*, 1998). Bawadi e colaboradores (2004) demonstraram que o BBI de soja inibiu a ativação tripsina-dependente dessas duas metaloproteases e sugerem que o bloqueio de cascatas proteolíticas pode diminuir a angiogênese patológica e, como consequência, retardar o processo metastático.

A fim de verificar o potencial de aplicação dos peptídeos sintetizados no controle da angiogênese, foi empregado o modelo da membrana corioalantóica (CAM) de *Gallus gallus domesticus*. Além do BBI enriquecido (BBI-E) empregado nos testes anteriores, foi testado também o BBI purificado em coluna de afinidade de tripsina (BBI-PA), praticamente destituído da atividade anti-tripsina, com o intuito de verificar a importância desse domínio na atividade observada.

Para todas as concentrações nenhum dos inibidores testados apresentou atividade angiogênica pronunciada, uma vez que todos foram significativamente diferentes do controle positivo utilizado (figura 29 – apêndice). Os resultados das contagens de bifurcações de vasos na membrana estão expostos na figura 24.

Como pode ser notado, ocorreu um padrão atípico na relação dose-resposta de alguns inibidores testados. O efeito anti-angiogênico apresentado pelo BBI-E e YCT-trip, por exemplo, mostrou relação inversa com a concentração aplicada. A semelhança nos perfis das duas formas de inibidores é evidência concreta que a inversão da relação dose-resposta nesse

caso não se deve à presença de impurezas, uma vez que a origem das duas moléculas é de natureza distinta. A ausência de atividade anti-angiogênica do BBI purificado em colunas de afinidade de tripsina, destituído da atividade anti-tripsina, é também evidência que esse padrão atípico de inibição é dependente da integridade dessa região.

Verifica-se ainda um efeito anti-angiogênico significativo para as espécies inibidoras de tripsina BBI-E, YCT-trip e pentamidina, quando em concentrações baixas, em relação ao controle negativo. Foi verificada ausência de atividade nas concentrações de 10^2 e 10^3 nM para os inibidores contendo dedo de zinco e para os inibidores de quimotripsina (YCA-quimo e BBI-PA).

A atividade anti-angiogênica foi observada para os inibidores de quimotripsina YCA-quimo e CPI-quimo somente nas concentrações mais altas de 10^4 e 10^5 nM. Além disso, também não foi notada atividade anti-angiogênica para o BBI tratado em coluna de afinidade de tripsina (BBI-PA), no qual a porção inibitória de tripsina foi suprimida. Esses resultados indicam que a regulação da angiogênese pelo BBI está correlacionada à atividade inibitória de tripsina.

Visto que o efeito anticarcinogênico do BBI é correlacionado principalmente com sua capacidade de inibir quimotripsina (Yavelow *et al.*, 1985) e que a inibição dessa protease não acarreta em mudanças na angiogênese (Figura 24, peptídeo YCA-quimo e BBI-PA), nossos resultados sugerem que o BBI possa suprimir o câncer por meio da modulação de vias fisiológicas independentes reguladas por uma das duas proteases.

Apesar dos efeitos verificados nos testes de inibição do proteassoma, os peptídeos contendo dedo de zinco não apresentaram atividade sobre a angiogênese no modelo analisado, exceto para as concentrações de 10^4 e 10^5 nM do CPI-quimo e 10^2 nM do HPI-trip.

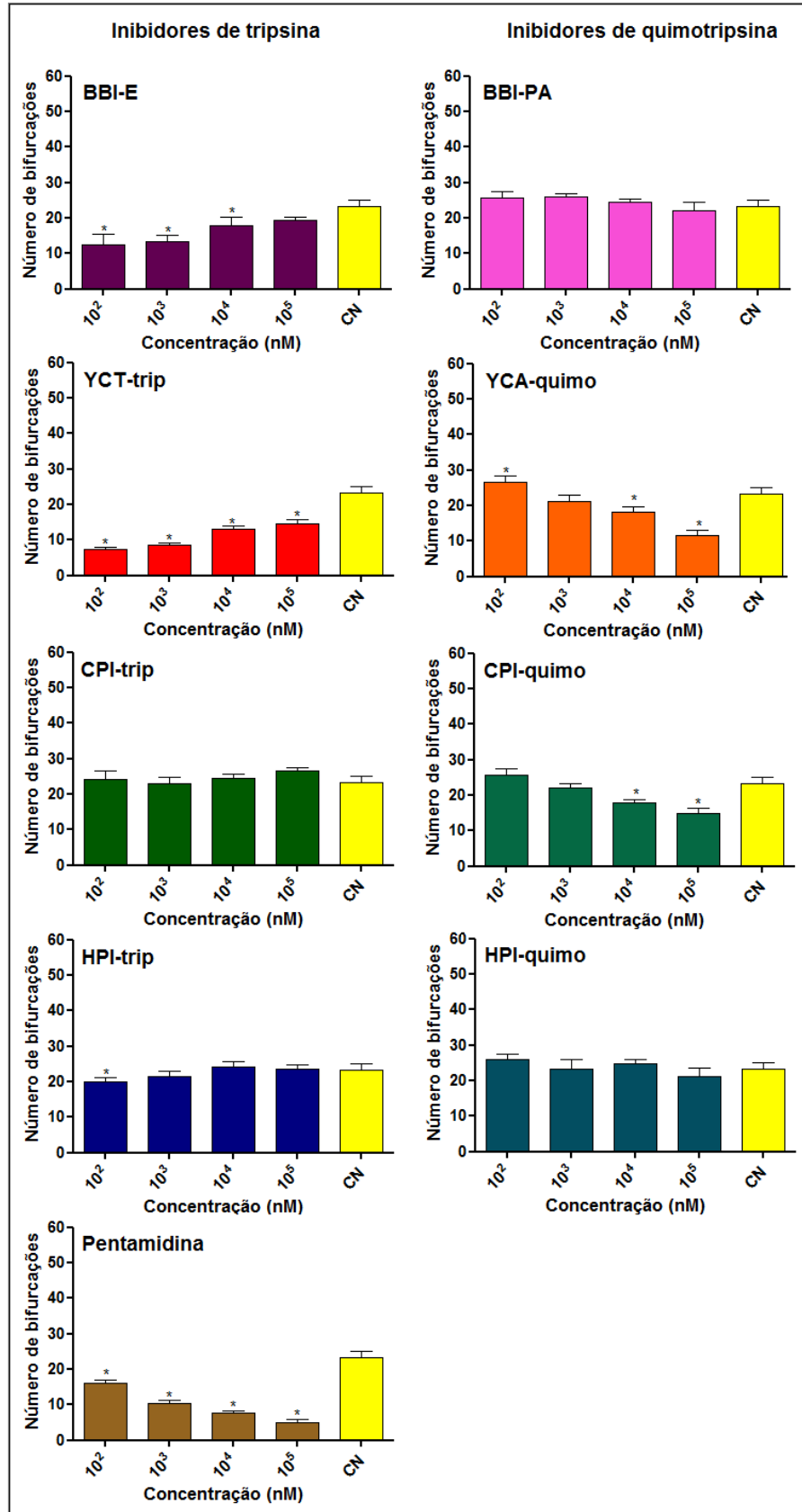


Figura 24: Número de bifurcações de vasos avaliado na presença de inibidores de proteases.

Na figura 25 são comparados os inibidores que apresentaram atividade anti-angiogênica na concentração de 10^2 nM. Pela análise estatística dos resultados pode ser observado que todos os inibidores foram ativos, sendo que o BBI-E e YCT-trip apresentaram mesma potencia anti-angiogênica que a pentamidina.

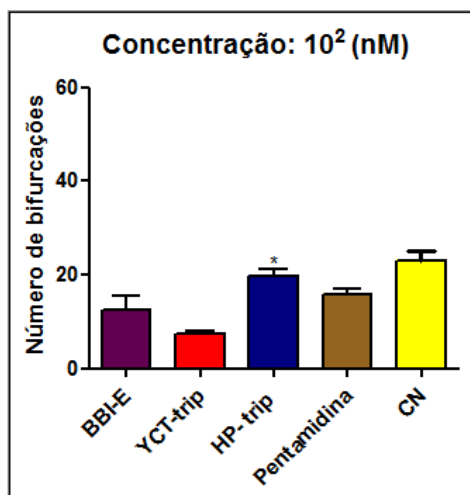


Figura 25: Atividade anti-angiogênica dos inibidores de tripsina na concentração de 10^2 nM. *atividade inibitória significativamente diferente em relação ao peptídeo YCT-trip ($p \leq 0,05$). $n = 8$.

Apesar do maior potencial anti-angiogênico da pentamidina, quando avaliada em concentrações acima de 10^2 nM, sua administração prolongada produz frequentemente reações adversas graves em humanos, diminuindo a taxa de crescimento e alterando a morfologia de hepatócitos (Parker *et al.*, 1993). Quando aplicada na membrana, a substância gerou lesões teciduais não verificadas para os outros inibidores (Figura 26). Podem ser visualizados focos hemorrágicos, com diminuição significativa da vasculogênese ao seu redor, de maneira dose-dependente (Figura 24).

O efeito é consistente com as atividades dos outros inibidores de tripsina, sob o aspecto da inibição da angiogênese, embora manifestado de maneira mais intensa, sugerindo que os mecanismos podem estar relacionados. Além disso, os inibidores de tripsina do tipo Kunitz, oriundos da soja, mostraram atividade anti-angiogênica por meio da inibição do VEGF, um importante estimulador da formação de novos vasos (Drewes *et al.*, 2012). Entretanto, grande parte dos efeitos provenientes da administração de pentamidina tem sido atribuídos à sua capacidade de se ligar ao sulco menor do DNA e inibir a replicação e a síntese de proteínas (Hildebrandt *et al.*, 1998). Alguns estudos também apontam sua ação direta sobre enzimas envolvidas na reparação de danos no DNA, e ressaltam a possibilidade

do seu uso como agente anticancerígeno (Chow *et al.*, 2004). Além disso, a pentamidina também inibe enzimas envolvidas na acetilação de histonas e clivagem de regiões alteradas do DNA (Kobayashi *et al.*, 2010).

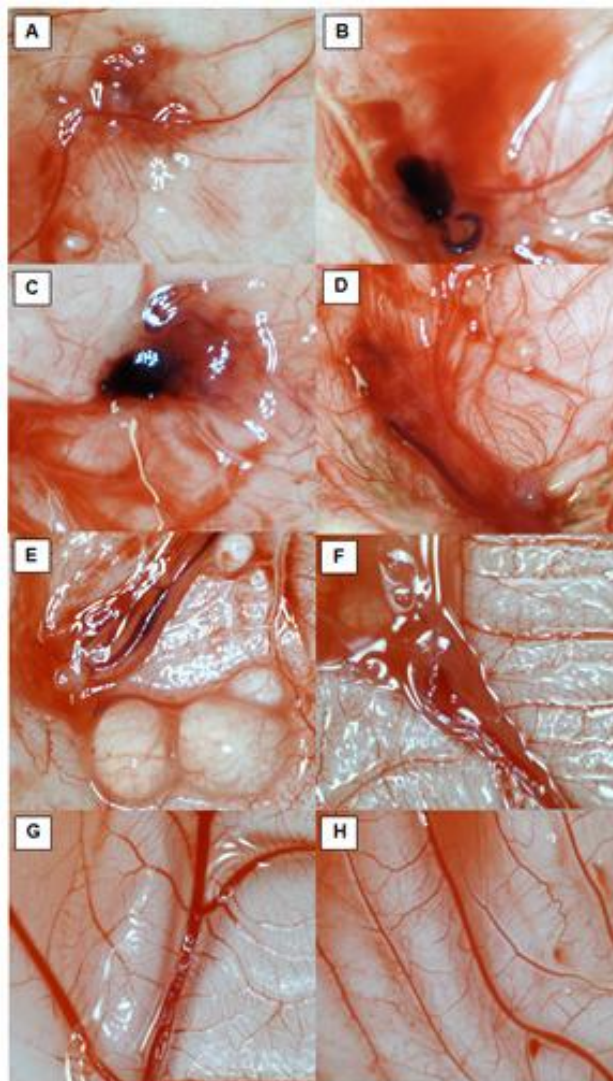


Figura 26: Membranas corioalantóicas após inoculação de cinco doses diárias de 7 μ L de pentamidina: A: 10^7 nM; B: 10^6 nM; C: 10^5 nM; D: 10^4 nM; E: 10^3 nM; F: 10^2 nM; G: 10^1 nM; H: Controle Negativo.

Embora a pentamidina apresente uma intensa resposta biológica, vários efeitos tóxicos foram apontados na literatura (Perilo *et al.*, 2010) que demonstram limitações no uso dessa droga. Por outro lado, o inibidor Bowman-Birk de soja foi considerado isento de toxicidade em humanos (Armstrong *et al.*, 2000), colocando esses inibidor, bem como seus análogos, como potenciais drogas anti-angiogênicas.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A introdução do motivo estrutural dedo de zinco prejudicou as atividades sobre as enzimas tripsina e quimotripsina, sobre a atividade do proteassoma e atividade anti-angiogênica;
- A maioria dos inibidores de tripsina estudados, especialmente a pentamidina, apresentaram inibição sobre a atividade quimotripsina-símile do proteassoma de Ratos Wistar;
- O inibidor Bowman-Birk apresenta atividade anti-angiogênica em membrana corioalantóica de *Gallus gallus domesticus*;
- A cabeça inibitória sintética anti-tripsina apresentou efeito anti-angiogênico de mesma intensidade que o BBI;
- A pentamidina mostrou-se excepcionalmente ativa como agente anti-angiogênico, reforçando a hipótese do mecanismo anti-angiogênico mediado por enzimas tripsina-símile.

7. Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

- Testar preparações nanoformuladas do BBI e peptídeos ativos, vislumbrando o aumento da atividade e biodisponibilidade;
- Avaliar a atividade angiogênica dos peptídeos inibidores de tripsina estudados em modelos de mamíferos;
- Testar a utilização da pentamidina e análogos como agentes anti-angiogênicos em modelos de mamíferos;
- Explorar o mecanismo de inibição das atividades tripsina-símile no entendimento da angiogênese.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramova, E. B., Astakhova, T. M., Erokhov, P. A., and Sharova, N. P. (2004) Multiple forms of the proteasomes and some approaches to their separation, *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 150-156.

Alberts, I. L.; Nadassy, K.; Wodak, S.J. (1998) Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Science* 7, 1700-1716.

Amorin, L. L. (2009) Formas reduzidas de inibidor bowman-birk, biodisponibilidade em óleo isolado de camundongo e atividade no proteassoma. Ouro Preto: UFOP, 78 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Andrade, M.H.G. & Mares-Guia, M. (1990) A Plausible Identification of the Secondary Binding Site in Trypsin and Trypsinogen. *Brazilian Journal Medical Biology Research* 23, 1223-1231.

Andres, M.E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson, M.E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., Mandel, G. (1999) CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 9873-9878.

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G. (2011) Minimal Functional Sites Allow a Classification of Zinc Sites in Proteins. *PLoS ONE* 6, 1-13.

Armstrong, W. B., Kennedy, A. R., Wan, X. S., Atiba, J., McLaren, C. E., and Meyskens, F. L., Jr. (2000) Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 43-47.

Arnold, F., & West, D. C. (1991) Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol. Ther.* 52, 407–422.

Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. (1974) A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. *Dev Biol* 41, 391–4.

Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L.; Akhtar, N. (2003) Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 49, 32–40.

Barbosa, J.A.R.G.; Silva, L.P.; Teles, R.C.L.; Esteves, G.F.; Azevedo, R.B.; Ventura, M.M.; Freitas, S.M. (2007) Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with β -Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. *Biophysical Journal* 92, 1638–1650.

Barrett, A. J. (1986) The classes of proteolytic enzymes. In *Plant Proteolytic Enzymes*, ed. M. J. Dalling, 1:1-16. Boca Raton, FL: CRC Press.

Bawadi, H. A., Antunes, T. M., Shih, F., and Losso, J. N. (2004) In vitro inhibition of the activation of pro-metalloproteinase-1 (pro-MMP-1) and pro-metalloproteinase-9 (pro-MMP-9) by rice and soybean Bowman-Birk inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4730–4736.

Benelli, R., Morini, M., Carrozzino, F., Ferrari, N., Minghelli, S., Santi, L., Cassatella, M., Noonan, D. M., Albin, A. (2002) Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J.* **16**, 267-9.

Berg, J. M., Sun, Y. (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081-1085.

Bertrand, J.A., Oleksyszyn, J., Kam, C., Boduszek, B., Presnell, S., Plaskon, R., Suddat, F.L., Powers, J.C., Williams, L.D. (1996) Inhibition of Trypsin and Thrombin by Amino(4-amidinophenyl)methanephosphonate Diphenyl Ester Derivatives: X-ray Structures and Molecular Models. *Biochemistry* 35, 3147–3155.

Billings P.C., Newberne P.M. & Kennedy A.R. (1990) Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 11, 1083-1086.

- Billings, P. C., St Clair, W. H., Maki, P. A., and Kennedy, A. R. (1992) Distribution of the Bowman Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Lett* 62, 191-197.
- Birk, Y., Gertler, A.; Khalef, S. (1963) A Pure Trypsin Inhibitor from Soya Beans. *Biochem. J.* 87, 281-284.
- Bowman D.E. (1946) Differentiation of Soy Bean Antitryptic Factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 63, 547-550
- Bulaj, G., Kortemme, T., Goldenberg, D. P. (1998) Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965-8972.
- Caccialupi, P., Ceci, L.R., Siciliano, R.A., Pignone, D., Clemente, A., Sonnante, G. (2010) Bowman-Birk inhibitors in lentil: Heterologous expression, functional characterisation and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. *Food Chemistry* 120, 1058–1066.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6, 389-395.
- Chan, W. C., & White, P. D. (2000) Fmoc solid phase peptide synthesis, *Oxford University Press*.
- Chen, X., Chu, M., Giedroc, D.P. (2000) Spectroscopic characterization of Co(II)-, Ni(II)-, and Cd(II)-substituted wild-type and non-native retroviral-type zinc finger peptides, *J. Biol. Inorg. Chem.* 5, 93–101.
- Chen Y-W., Huang S-C., Lin-Shiau S-Y., Lin J-K. (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* 26, 1296-1306.

Chow T.Y., Alaoui-Jamali M., Yeh C., Yuen L., Griller D. (2004) The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer. *Mol Cancer Ther* 3, 911-919.

Clemente, A., & Domoney, C. (2006) Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr Protein Pept Sci* 7, 201-216.

Clemente, A., Moreno, F.J., Marin-Manzano Mdel, C., Jimenez, E., Domoney, C., (2010) The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 396-405.

Clemente, A., Sonnante, G., Domoney, C., (2011) Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Current Protein & Peptide Science* 12, 358-373.

Connor T. H., Trizna Z. (1992) Pentamidine isethionate is negative in tests for microbial mutagenicity and chromosomal breakage in vitro. *Toxicology Letters* 63, 69-74.

Dai, H., Ciric, B., Zhang, G.X., Rostami, A., (2012) Interleukin-10 plays a crucial role in suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Bowman-Birk inhibitor. *Journal of Neuroimmunology* 245, 1-7.

Debowski, D.; Łukajtis, R.; Łegowska, A.; Karna, N.; Piłkuła, M.; Wysocka, M.; Maliszewska, I.; Sińczyk, M.; Lesner, A.; Rolka, K. (2012) Inhibitory and antimicrobial activities of OGTI and HV-BBI peptides, fragments and analogs derived from amphibian skin. *Peptides* 35 276-284.

Deguchi, J. O., Aikawa, M., Tung, C. H., Aikawa, E., Kim, D. E., Ntziachristos, V., Weissleder, R., Libby, P. (2006) Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 114, 55-62.

Deshimaru, M., Yoshimi, S., Shioi, S., and Terada, S. (2004) Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitors of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and pseudogenes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1279-1286.

Dittmann, K.; Mayer, C.; Kehlbach, R.; Rodemann, H.P. (2008). The radioprotector Bowman-Birk proteinase inhibitor stimulates DNA repair via epidermal growth factor receptor phosphorylation and nuclear transport. *Radiotherapy and Oncology* 86, 375–382.

Drewes, C. C., Dias, R.Y.S., Hebeda, C.B., Simons, S.M., Barreto, S.A., Ferreira Junior, J.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., Farsky, S.H.P. (2012) Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* 60, 333–340.

Duncan, M. E., Richardson, J. P., Murray, G. I., Melvin, W. T., Fothergill J. E. (1998) Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form . *Eur. J. Biochemg.* 15, 37–43.

Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.

Ellis, R.J. (1994) Roles of molecular chaperones in the protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 117-122.

Elrod-Erickson, M., Benson, T.E., Pabo, C.O. (1998) High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition. *Structure* 6, 451-464.

Erlanger, B.F., Cohen, W., Kokowsky, N. (1961) Preparation and properties of 2 new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271.

Fear, G., Komarnytsky, S., Raskin, I., (2007) Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 354–368.

Fernandez, J.H., Mello, M.O., Galgaro, L., Tanaka, A.S., Silva-Filho, M.C., Neshich, G. (2007) Proteinase inhibition using small Bowman-Birk-type structures. *Genetics and Molecular Research* 6, 846-858.

Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Nat Cancer Inst.* 82, 4–6.

Folkman, J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27–31.

Folkman, J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature* 6, 273-286.

Frankel, A. D., Berg, J. M., Pabo, C. O. (1987) Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Biochemistry* 84, 4841-4845.

Gariani, T., McBride, J. D., and Leatherbarrow, R. J. (1999) The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochim Biophys Acta* 1431, 232-237.

Giedroc, D.P., Keating, K.M., Williams, K.R., Konigsberg, W.H., Coleman, J.E. (1986) Gene 32 protein, the single-stranded DNA binding protein from bacteriophage T4, is a zinc metalloprotein. *Proc. Natl. Acad.* 83, 8452-8456.

Gran, B., Tabibzadeh, N., Martin, A., Ventura, E.S., Ware, J.H., Zhang, G.X., Parr, J.L., Kennedy, A.R., Rostami, A.M. (2006) The protease inhibitor, Bowman–Birk Inhibitor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: a potential oral therapy for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 12, 688–697.

Gray, H. B. (1980) Electronic absorption spectroscopy. *Adv. Inorg. Biochem.* 2, 1-25.

Grishin, N.V. (2001) Treble clef finger-a functionally diverse zinc-binding structural motif. *Nucleic Acids Res* 29, 1703-1714.

Haas, K.L., Franz, K.J. (2009) Application of Metal Coordination Chemistry to Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem Rev.* 109, 4921–4960.

Hamilton, H. L. (1965) *Lillie's Development of the Chick*. 3rd edn. Holt, Rinehart and Winston, N Y.

Hasina, R., Lingen, M.W. (2001) Angiogenesis in Oral Cancer. *Journal of Dental Education* 65, 1282 - 1290.

Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C. C., Lumen, B. O. (2009) Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides* 30, 426-430.

Hildebrandt, E., Boykin, D., Kumar, A., Tidwell, R.R., Dykstra, C.C. (1998) Identification and characterization of an endo/exonuclease in *Pneumocystis carinii* that is inhibited by dicationic diarylfurans with efficacy against *Pneumocystis pneumonia*. *J Eukaryot Microbiol* 45, 112-121.

Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M.S.; Wildiers, H.; Vanoosterom, A.T. & de bruijn, E.A. (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56, 549-80.

Ishida, T. (2006) Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process. *Biochemistry* 45, 5413-5420.

Iuchi, S. (2001). Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 625–635.

Iuchi, S., Kuldell, N. (2005) C₂H₂ Zinc Fingers As DNA Binding Domains. In *Zinc Finger Proteins: from atomic contact to cellular function*. Landes Bioscience. Georgetown, 7-13.

Jensen, B., Unger, K.K., Uebe, J., Gey, M., Kim, Y.M., Flecker, P. (1996) Proteolytic cleavage of soybean Bowman-Birk inhibitor monitored by means of high-performance capillary electrophoresis. Implications for the mechanism of proteinase inhibitors. *J.Biochem.Biophys.Methods* 33, 171-185.

Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Freitas, S.M. (2010) Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters* 293, 73–81.

Joubert, F.J., Kruger, H., Townshend, G.S., Botes, D.P. (1979) Purification, Some Properties and the Complete Primary Structures of 2 Protease Inhibitors (De-3 and De-4) from *Macrotyloma-Axillare* Seed. *European Journal of Biochemistry* 97, 85-91.

Karamysheva, A.F. (2008) Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry* 73, 751-762.

Kato, K. S., Umezawa, Y., Mikoshiba, K., Aruga, J., Tate, N. U. (2009) Stability of folding structure of Zic zinc finger proteins. *Bioch and Bioph Research Communications* 384, 362–365.

Katrancioglu, N., Karahan, O., Kilic, A.T., Altun, A., Katrancioglu, O., Polat, Z.A. (2012) The antiangiogenic effects of levosimendan in a CAM assay. *Microvascular Research* 83, 263–266.

Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., et al. (2000) Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *J Nutr* 130, 467S-471S.

Kennedy A.R. (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* 78, 167-209.

Kennedy, A., Beazer-Barclay, Y., Kinzler, K., Newberne, P. (1996) Suppression of carcinogenesis in the intestines of min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer Res.* 56, 679-682.

Kennedy, A., Billings, P., Wan, X., Newberne, P. (2002) Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 43, 174-186.

Kennedy, A.R. & Wan, X.S. (2002) Effects of the Bowman-Birk inhibitor on growth, invasion, and clonogenic survival of human prostate epithelial cells and prostate cancer cells. *Prostate* 50, 125-133.

Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F., Hirano, H. (2000) N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome, *J Biol Chem* 275, 4635-4639.

Kisselev, A.F., Callard, A., Goldberg, A.L. (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 8582-8590.

Kiyota, S. (2000) Peptídeos de conformação restrita relacionados ao sítio 2 do fator de crescimento de fibroblastos ácido humano (hfgf-1): estudo sobre estrutura e atividade. São Paulo: USP,. 127p. Tese (doutorado) - Instituto de Química, Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo.

Klemes, Y., Kidron, M., Mayer, M., Fibach, E. (1984) Inhibition of phorbol-ester-induced adhesion of differentiating human myeloid leukemic cells by pentamidine-isethionate. *Differentiation* 27, 141-145.

Klug, A., Schwabe, J. W. (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *Faseb J.* 9, 597-604.

Kobayashi, J., Kato, A., Ota1,Y., Ohba1, R., Komatsu, K. (2010) Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Molecular Cancer* 9:34.

- Koblinski, J. E., Ahram, M., Sloane, B. F. (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291, 113-135.
- Krishna, S. S., Majumdar, I., Grishin, N. V. (2003) Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 31, 532-550.
- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gilli, G.N., Kikkawa, U. (1996). Protein-Protein Interaction of Zinc Finger LIM Domains with Protein Kinase C. *The journal of biological chemistry* 49, 31029–31032.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 39–46.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., *et al.* (2001) International Human Genome Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Larionova, N.J., Gladysheva, I.P., Tikhonova, T.V., Kazanskaya, N.F. (1993) Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of Bowman-Birk type of soy inhibitor. *Biochemistry (Moscow)* 58, 1437 – 1444.
- Lee, S.B., Haber, D.A. (2001) Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res.* 264, 74-99.
- Li, J., Ye, L., Cook, D. R., Wang, X., Liu, J., Kolson, D.L., Persidsky, Y., Ho, W-Z. (2011) Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages. *Journal of Neuroinflammation* 15, 1-9.
- Losso, J. N. (2008) The biochemical and functional food properties of the bowman-birk inhibitor. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 94-118.

- Ma, Z., Jacobsen, F. E., Giedroc, D. P. (2009) Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. *Chem Rev.*109, 4644–4681.
- Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C., Miranda, M. T. M. (2004) Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova* 27, 781-789.
- Mackay, J., Crossley, M. (1998) Zinc fingers are sticking together. *Trends Biochem. Sci.* 23, 1-4.
- Malkowicz, S. B., McKenna, W. G., Vaughn, D. J., Wan, X. S., Propert, K. J., Rockwell, K., Marks, S. H., Wein, A. J., and Kennedy, A. R. (2001). Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 48, 16-28.
- Matthews, J.M., Sunde, M. (2002) Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life.* 54, 351-355.
- McBride J.D., Brauer A.B.E., Nievo M. & Leatherbarrow R.J. (1998) The Role of Threonine in the P2 Position of Bowman-Birk Proteinase Inhibitors: Studies on P2 Variation in Cyclic Peptides Encompassing the Reactive Site Loop. *J.Mol.Biol.* 282, 447-457.
- McBride J.D., Freeman N., Domingo G.J. & Leatherbarrow R.J. (1996) Selection of Chymotrypsin Inhibitors from a Conformationally-constrained Combinatorial Peptide Library. *J.Mol.Biol.* 259, 819-827.
- McBride J.D., Watson E.M., Brauer A.B.E., Jaulent A.M. & Leatherbarrow R.J. (2002) Peptide Mimics of the Bowman-Birk Inhibitor Reactive Site Loop. *Biopolymers* 66, 79-92.
- McCormick, D.L., Johnson, W.D., Bosland, M.C., Lubet, R.A., Steele, V.E., 2007. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutrition and Cancer* 57, 184–193.

- Merrifield, R. B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J Am Chem Soc* 85, 2149-2154.
- Messina, M., Barnes, S. (1991). The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 541 – 546.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A., (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4,1609-1614.
- Missirlis, E., Karakulakis, G., Maragoudakis, M. E. (1990) Angiogenesis is associated with collagenous protein synthesis and degradation in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue Cell* 22, 419-426.
- Monk, J. P. & Benfield, P. (1990) Inhaled pentamidine: an overview of its pharmacological properties and a review of its therapeutic use in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Drugs* 39, 741 -756.
- Mörking, P.A., Rampazzo, R.C.P., Walrad, P., Probst, C.M., Soares, M.J., Gradia, D.F., Pavoni, D. P., Krieger, M.A., Matthews, K., Goldenberg, S., Fragoso, S. P., Dallagiovanna, B. (2012) The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 790-799.
- Negi, S., Itazu, M., Imanishi, M., Nomura, A., Sugiura, Y. (2004) Creation and characteristics of unnatural CysHis3-type zinc finger protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 421–425.
- Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Cepeda, V., Iborra, S., Carrión, J., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J.M. (2005) Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. *Chemistry & Biodiversity* 2, 1387-1400.
- Nishino, N., Aoyagi, H., Kato, T., Izumiya, N. (1977) Studies on the synthesis of proteinase inhibitors. *J. Biochem* 82, 901-909.

Nomura, A., & Sugiura, Y. (2004) Hydrolytic reaction by zinc finger mutant peptides: successful redesign of structural zinc site into catalytic zinc sites, *Inorg. Chem.* 43, 1708–1713.

Nyberg, P., Ylipalosaari, M., Sorsa, T., Salo, T. (2006) Trypsins and their role in carcinoma growth. *Exp Cell Res* 312, 1219-1228.

Oliveira, M. E., Andrade, M. H. G. (2004) Caracterização e Atividades Bioilógicas de inibidores Bowman Birk da Semente e broto da *Macrotyloma axillare*. Universidade Federal de Ouro Preto. 1-92.

Osman, M.A., Reid, P.M., Weber, C.W. (2002) Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry* 78, 419-423.

Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., and Oleksy, A. (2005) The many faces of protease–protein inhibitor interaction. *The EMBO Journal* 24, 1303–1310.

Parker, C.L., Finley, R.B., Wrigh, B.G., Nzeribe, R., Stewart, J. (1993) The inhibitory effects of pentamidine on biochemical events in human liver cells. *Toxic. in Vitro* 7, 177-184.

Párraga, G., Horvath, S., Hood, L., Young, E. T., Klevit, R.E. (1990) Spectroscopic studies of wild-type and mutant "zinc finger" peptides: Determinants of domain folding and structure. *Biochemistry* 87, 137-141.

Patan, S., Haenni, B., Burri, P.H. (1996) Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken choriollantoic membrane: Pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc. Res.* 51, 80-98.

Perilo, C.S., Pereira, M. T., Santoro, M. M., Nagem, R. A. P. (2010) Structural binding evidence of the trypanocidal drugs Berenil® and Pentacarinat® active principles to a serine protease model. *Int. J. of Biological Macromolecules* 4, 502–511.

Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J., and Fletterick, R. J. (1995) Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* 34, 1489-1499.

Poon, R. T-P., Fan, S-T., Wong, J. (2003) Clinical Significance of Angiogenesis in Gastrointestinal Cancers. *Annals of Surgery* 238, 9–28.

Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D., and James, K. E. (2002) Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* 102, 4639-4750.

Pućkowska, A., Midura-Nowaczek, K., Bruzgo, I. (2008) Effects of netropsin and pentamidine amino analogues on the amidolytic activity of plasmin, trypsin and urokinase. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research* 65, 213-215.

Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M., and Lopez-Otin, C. (2003) Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4, 544-558.

Riccardi, G., Milano, A., Pasca, M.R., Nies, D.H. (2008) Genomic analysis of zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett* 287, 1-7.

Richardson, M. (1991) Seed Storage Proteins: The enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry* 5, 259-305.

Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671 – 674.

Rosenthal, G. J., Corsini, E., Craig, W. A., Comment, C. E., and Luster, M. I. (1991) Pentamidine: An Inhibitor of Intedeukin-I That Acts via a Post-translational Event. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107, 555-56.

Ryan, C.A. (1990) Protease Inhibitors in Plants - Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28, 425-449.

Safavi, F., Rostami, A., (2012) Role of serine proteases in inflammation: Bowman–Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Pathology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.09.014>.

Santos, Alexandre Gonçalves. (2006) Estudos farmacocinéticos de Inibidores Bowman-Birk da semente de *Macrotyloma axillare* em camundongos Swiss. Ouro Preto: UFOP, 85 p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Sattar, R., Ali, S.A., Kamal, M., Khan, A.A., Abbasi, A. (2004) Molecular mechanism of enzyme inhibition: prediction of the three-dimensional structure of the dimeric trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* by homology modelling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 755-765.

Schweigerer, L., & Fotsis, T. (1992) Angiogenesis and angiogenesis inhibitors in paediatric diseases. *Eur. J. Pediatr.* 151, 472–476.

Schwizer, R. (1995) 100 years Lock- and -Key Concept: Are Peptide Keys Shaped and Guide to their Receptors by Target Cell Membrane? *Biopolymers* 37, 5-16.

Selik, R.M., Starcher, E.T., Curran, J.W. (1987) Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations and trends. *AIDS* 1, 175-182.

Shi, Y., Richard D. B., Jeremy M. B. (1993) Metal binding properties of single amino acid deletion mutants of zinc finger peptides: Studies using cobalt(ii) as a spectroscopic probe. *Biophys. J.* 64, 749-753.

Song, G., Zhou, M., Chen, W., Chen, T., Walker, B., Shaw, C. (2008) HV-BBI - A novel amphibian skin Bowman–Birk-like trypsin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, 191–196.

Sugiura, Y. (2001) Natural and artificial zinc finger proteins. *Riken Review* 35, 102-104.

Talhout, R. & Engberts, J.B.F.N. (2001) Thermodynamic analysis of binding of p-substituted benzamidines to trypsin. *Eur. J. Biochem.* 268, 1554-1560.

Talhout, R., Villa, A., Mark, A.E., Engberts, J.B.F.N. (2003) Understanding Binding Affinity: A Combined Isothermal Titration Calorimetry/Molecular Dynamics Study of the Binding of a Series of Hydrophobically Modified Benzamidinium Chloride Inhibitors to Trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10570–10579.

Tanaka K. (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc.Jpn.Acad.* 85, 12-30.

Tobelem, G. (1990) Endothelial cell growth: biology and pharmacology in relation to angiogenesis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1, 703 – 705.

Tsuztnski, GP, Nicosia, RF. (1996) The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioassays* 18, 71–76.

Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-799.

Voet, D., Voet, J.G. & Pratt, C.W. (2000) *Catálise enzimática*. In *Fundamentos de Bioquímica*. Primeira edição Ed. Artes Médicas Sul. Porto Alegre, 281-316.

Voutsadakis, I.A. (2008) The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1782, 800-808.

Ware, J.H., Wan, X.S., Rubin, H., Schechter, N.M., Kennedy, A.R. (1997) Soybean Bowman Birk Protease Inhibitor Is a Highly Effective Inhibitor of Human Mast Cell Chymase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344, 133-138.

Wang, J., Shen, W-C. (2000) Gastric retention and stability of lipidized Bowman–Birk protease inhibitor in mice. *International Journal of Pharmaceutics* 204, 111–116.

Westman, B.J., Perdomo, J., Matthews, J.M., Crossley, M., Mackay, J.P. (2004) Structural studies on a protein-binding zinc-finger domain of Eos reveal both similarities and differences to classical zinc fingers. *Biochemistry* 43, 13318-13327.

Winge, DR. (2007) *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*. Bertini, I.; Gray, HB.; Stiefel, EI.; Valentine, JS., editors. University Science Books; Sausalito, CA: p. 613.

Yamasaki, Y., Satomi, S., Murai, N., Tsuzuki, S., Fushiki, T., (2003) Inhibition of membrane-type serine protease 1/matrilptase by natural and synthetic protease inhibitors. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 49, 27–32.

Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W., Kennedy, A.R., (1985) Nanomolar concentrations of Bowman–Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5395–5399.

9. *Apêndice*

9. APÊNDICE

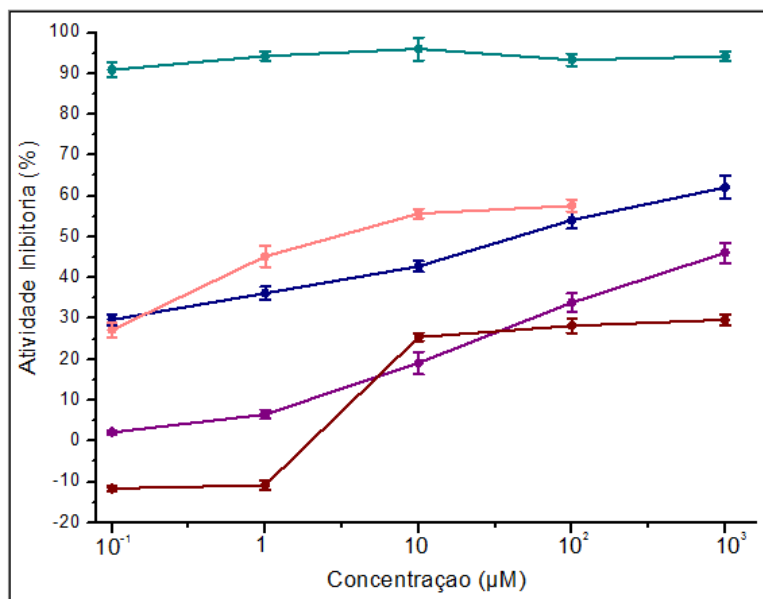


Figura 27: Curva dose-resposta da avaliação da atividade quimotripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar na presença dos inibidores. BBI (azul), Pentamidina (verde) e peptídeos YCA-quimo (rosa), CPI-quimo (lilás) e HPI-quimo (vinho). Substrato: Suc-LLVY-MCA.

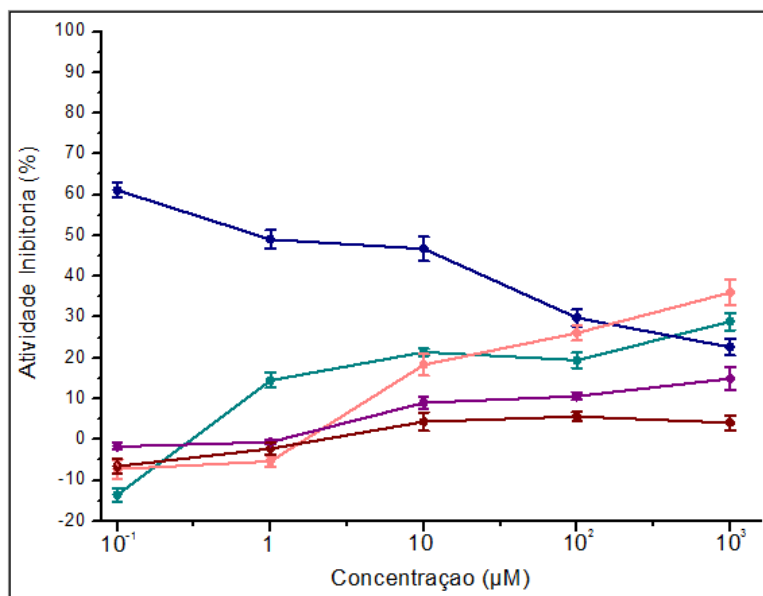


Figura 28: Curva dose-resposta da avaliação da atividade tripsina-símile de proteassoma 20S de fígado de Ratos Wistar na presença dos inibidores. BBI (azul), Pentamidina (verde) e peptídeos YCT-trip (rosa), CPI-trip (lilás) e HPI-trip (vinho). Substrato: Boc-VPR-MCA.

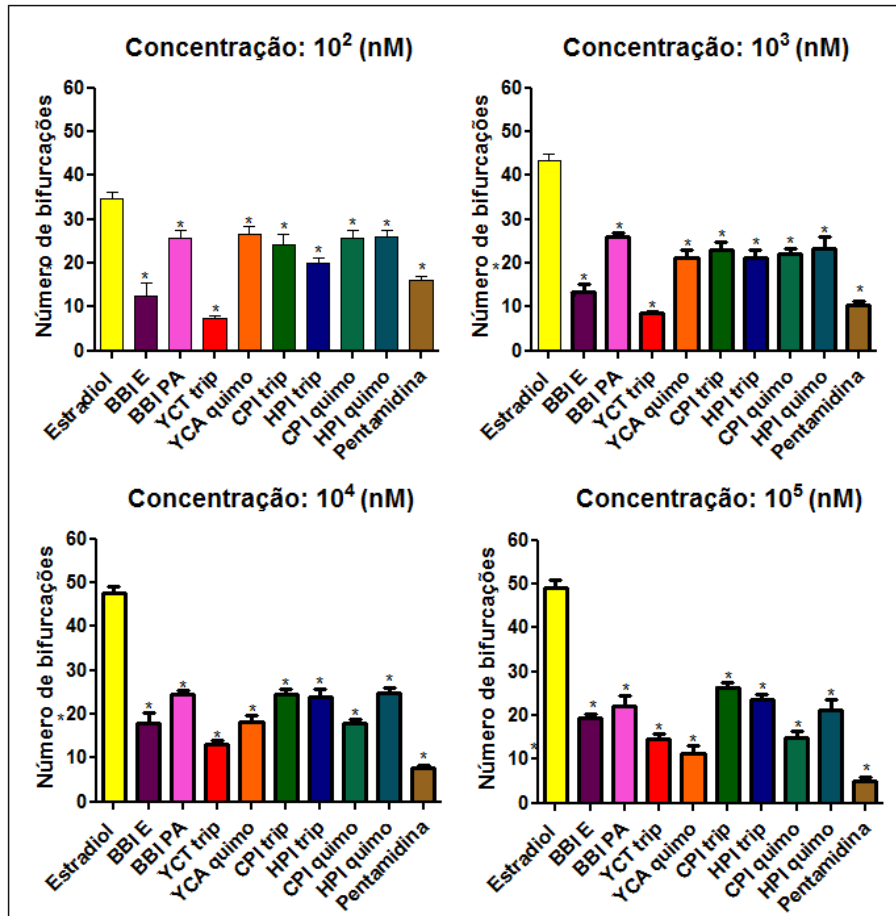


Figura 29: Comparação do número de bifurcações e controle positivo (Estradiol).

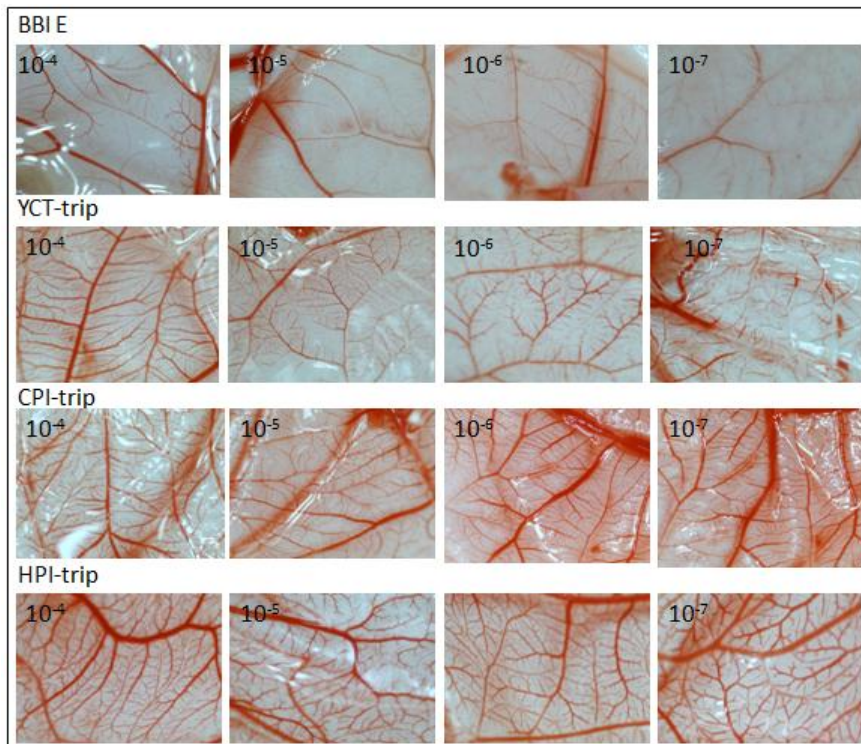


Figura 30: Membranas corioalantóicas após inoculação de cinco doses diárias de 7 μL de cada inibidor.

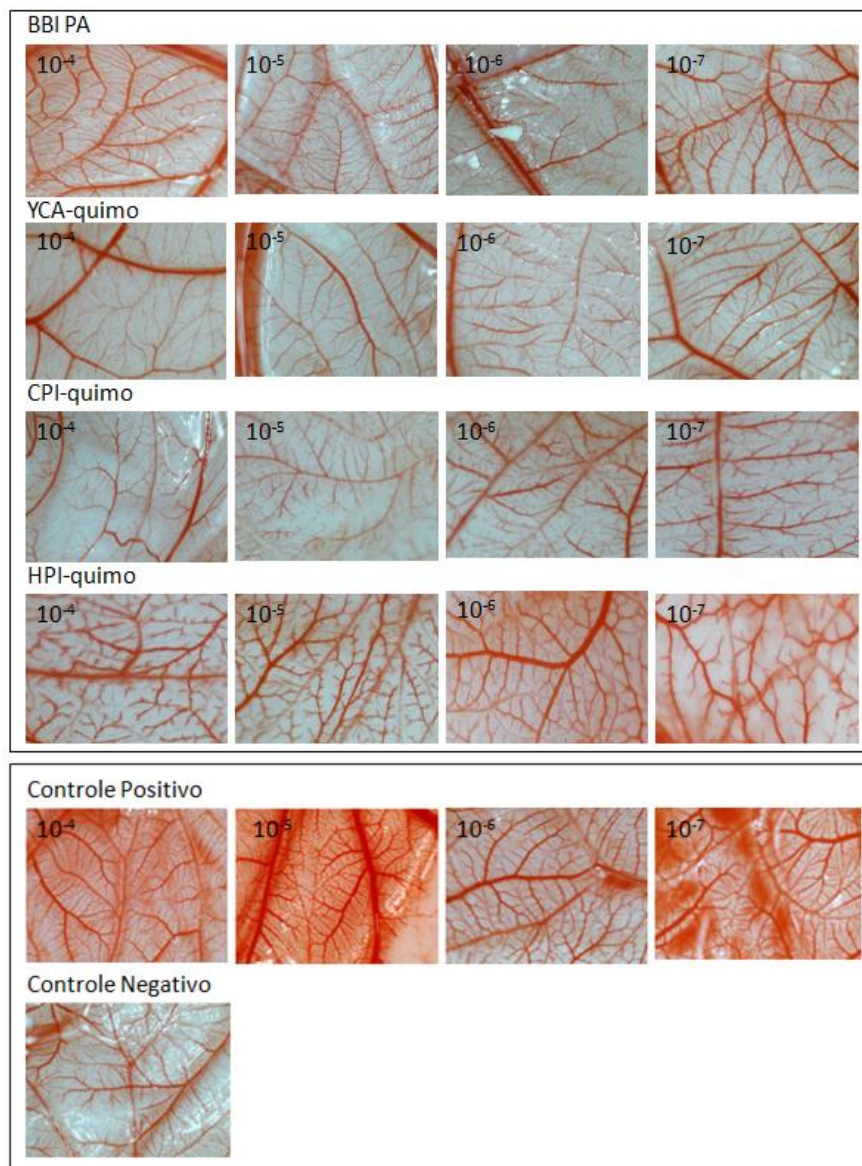


Figura 30: Continuação.